

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ÁREA DE INMUNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE
QUIMIOQUINAS Y DE LA RESPUESTA
MIGRATORIA INDUCIDA POR SUS LIGANDOS
EN SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS Y
LINFOCITOS PORCINOS.

TESIS DOCTORAL

SARA MORENO RIVERA

DIRECTORES: FERNANDO ALONSO MORENO,
JAVIER DOMÍNGUEZ JUNCAL Y BELÉN ÁLVAREZ VEGA

2011

Los doctores Fernando Alonso Moreno, Javier Domínguez Juncal y Belén Álvarez Vega, investigadores del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA),

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “Estudio de la expresión de receptores de quimioquinas y de la respuesta migratoria inducida por sus ligandos en subpoblaciones de monocitos y linfocitos porcinos” y presentada por Sara Moreno Rivera, ha sido realizada bajo su dirección, en el departamento de Biotecnología del INIA, considerando que reúne los requisitos para optar al grado de doctor en Biología.

VºBº de los DIRECTORES

Fdo.: Fernando Alonso Moreno

Fdo.: Javier Domínguez Juncal

Fdo.: Belén Álvarez Vega

La interesada:

Fdo.: Sara Moreno Rivera

Esta tesis ha sido financiada por una beca FPI-INIA concedida al proyecto: "AGL2005-07073-C02-01: nuevas estrategias de inmunización frente al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VPRRS): estudios inmunológicos y eficacia de antígenos fusionados a quimioquinas" y con un contrato asociado al proyecto "CDS2006-0007 CONSO-LIDER INGENIO 2010 PORCIVIR".

A mi familia

A Fermín

“En las cenizas del fracaso está la sabiduría” -Amaral, 2011-

Tenía miedo de empezar esta parte de la tesis por una superstición que me acompaña desde el colegio: nunca escribo mi nombre en un examen hasta el momento de entregarlo. Quizá es porque pienso que me da “gafe”, por eso es una superstición. Así que aquí estoy, dos días antes de imprimir la tesis, sin escribir las GRACIAS. Por otra parte, la parte más fácil de escribir...

En primer lugar quiero agradecer a Fernando la oportunidad que me dio de trabajar en este laboratorio. También a Javier y a Belén por haber aceptado dirigir esta tesis junto con Fernando. Durante estos años he aprendido muchísimo y me considero afortunada de haberos tenido a los tres como directores (¡aunque hubiera discrepancias en algún momento!). Fernando, gracias por estar pendiente de mi en todo momento, por tu paciencia, por tu apoyo y optimismo, por preguntarme TODOS los días que tal y que iba a hacer hoy, por dejar todo para ayudarme, y por tu sentido del humor que ha sido motivador en muchas ocasiones. También por tu espíritu crítico y las discusiones con Javier por la clasificación de las subpoblaciones celulares.

Javier, trabajar contigo es maravilloso porque contagias tus ganas de SABER, porque tu sabiduría se difunde y educa, porque siempre estás pensando en lo siguiente que podemos hacer y nunca te quedas sin ideas o sin hilos de por dónde tirar. Porque eres tan contagioso, que cada vez que salía de tu despacho, lo hacía con unos cuantos artículos, que han contribuido a que aprenda muchísimo. También quiero agradecerte que estés pendiente de todos y nunca nos abandones (científicamente) a nuestra suerte. Belén, sólo puedo decirte (cómo te he dicho muchas veces) que no hubiera existido esta tesis sin ti, no solo por enseñarme toda la genética molecular, por tener hechas las cosas que yo justo tenía en la cabeza antes de que las dijera en voz alta, por tener esa capacidad casi infinita de trabajo y por tus ideas y tus manos científicamente mágicas (“pues Belén lo ha hecho y le ha salido bien”). Sino por estar apoyándome todo el tiempo, porque en cada crisis has estado conmigo, porque me venías a buscar un segundo antes de que me pusiera a llorar, porque parece que sabes de antemano en que sitio tenías que estar para ayudarme. No puedo destacar lo suficiente tu capacidad profesional y humana, eres unas de las mejores personas que conozco.

También quiero tener unas palabras para los otros jefes del laboratorio. Conchi, gracias por compartir conmigo toda tu sabiduría de citometría de flujo, y también del 2E3 (¡que viva el 2E3, que tantas alegrías me ha dado!), por hacerme PENSAR antes de hacer un experimento, y por decirme las cosas como son, si un experimento es una porquería, pues lo es! Aparte de lo científico, gracias por nuestras charlas de política, los paseos en coche y tu mudanza a Getafe!

Ángel (con acento en la mayúscula, eh!) muchas gracias por ayudarme siempre en todo, eres una de las personas más inteligentes que conozco y siempre piensas en el detalle que a los demás se nos ha escapado y eres capaz de solucionar mis dudas. También por tus cantos que se escuchan desde el cuarto de cultivos, que siempre son agradables!!

Asímismo quiero agradecer a las Dras. Leonor Kremer y María Montoya y a la gente de sus laboratorio por colaborar con nosotros en esta tesis y por su amabilidad y simpatía conmigo personalmente.

No puedo escribir en dos folios, lo contenta que estoy de haber formado parte de este laboratorio, lo afortunada que me siento de haber pasado esta etapa en Inmunología y sinceramente, de habérmelo pasado tan bien. Todo esto, gracias por supuesto a toda las personas maravillosas que componen este grupo (no es peloteo, eh!).

Paloma: eres la alegría personificada, el buen rollo, la energía, la simpatía y el alborozo. Y por seguir con los sinónimos, también eres la jarana y la fiesta!! Gracias por tener esa personalidad, que cualquier problema se soluciona con una sonrisa, por ser una mujer (iba a decir chica, pero tienes dos churumbeles, asique...) extremadamente fuerte y optimista y sacar una sonrisa siempre. Dejo aparte, lo de ayudarme con cultivos, preparar sobrenadantes... es menos divertido. También tengo que plasmar aquí el momento de "sin tocar, a mi sin tocar, eh!!".

Elena: gracias por toda tu ayuda en el labo, que me ha hecho la vida más fácil ¡que hubiera hecho sin ti! En las purificaciones, en los ELISAS... por otro lado, gracias por los pasteles y bollos que preparas con tanto amor, por los mercadillos con tus cosas manuales, por tu creatividad y tus ideas!

Maite: ya en la distancia quiero decir que pusiste el laboratorio en orden en un mes, las puntas, el lavavajillas, el autoclave, las facturas!!! Has sido la mami para todos y un amor de persona. Muchas gracias!!

María: madre mía, eres un vendaval! Aparte de que *pulules* por la pecera, me arrastres al consumismo y crees un cono de ignorancia entre incubación e incubación, gracias por enseñarme cosas de virus, por ayudarme con el confocal y por apuntarte a todo. Gracias por que tengo una nueva gran amiga (que hasta se viene a Getafe!!).

Zoo: aunque contigo he compartido menos tiempo, me alegro de haberte pasado parte de mis cosas y espero que te ayuden en el futuro. Eres una chica muy trabajadora e inteligente y espero que te vaya todo muy bien.

Vero: a ti también en la distancia, gracias porque te di mis células y nunca más me preocupé por ellas! Porque eres super trabajadora, lo pillas todo a la primera, y además tienes energía para hacer 8000 actividades fuera del labo y de lo más variopinto!

A las flus: Carmen, esas charlas con esos pitis en la terraza, cuánto hemos compartido, muchas gracias por escuchar mis cosas y confiar en mí para contarme las tuyas y hablarme de cosas raras como craquear el móvil y otro datos en arameo!! He hecho otra amiga. Blanca, vaya época hemos pasado! Gracias por tu humor tan particular y por confiar en mí para ayudarte en el labo y fuera de él. Gustavo, tribunal de tesis de mi tío y asistes a la mía, me alegro de haber compartido espacio vital contigo durante un tiempo porque ha sido enriquecedor.

A todas las demás, que no me olvido: M^a Ángeles, Chari, (de las flus), Elena P, Ana, Loa, todas me habéis ayudado en algún momento aunque haya sido con una sonrisa y un "¿Qué tal?" y habéis contribuido a hacer especial mi época de tesis. También quiero recordar a Sylvina, nunca te olvidaré y creo que nunca se quitará esa caja del fondo del congelador...

También gracias a toda la gente del departamento: Javi, Nereida, Julio, Silvia, Carmen, María, Bruno, Laura y todos los demás, por la ayuda, las excursiones, las comidas en el campo, las cenas sorpresa...Por preguntar siempre por mi estado de ánimo y por ser un grupo fenomenal.

He dejado la última a Tere, porque amiga, tu entras tanto en el plano profesional como en el personal de manera importante. He tenido la gran suerte de trabajar con una de mis mejores amigas. Desde que me avisaste de la entrevista, pasando por las broncas ("¡Sara, te has dejado la frente en la cabina de cultivos"), cuando nos mandábamos a paseo y a estas les daba miedo. Acabando con los experimentos compartidos, con las risas por las cuentas ("8x3...no me viene nada")... Pero sobre todo, la complicidad que hemos alcanzado. No me hace falta que me digas las cosas que piensas, ni a ti tampoco que te las diga yo. Estás siempre conmigo, si no te llamo en dos días, ya me siento rara

y eso es “mu bonito”. Creo que puedo agradecerte de aquí a Lima y no sabrías lo importante que eres para mí. Te quiero mucho Tere, y ahora que hemos pasado por esto te quiero más.

Pasando a lo personal, quiero agradecer a mi familia. Papa y mamá, gracias por darme la oportunidad de estudiar, por no coaccionarme para nada y dejarme libertad siempre, por esforzarnos durante toda mi vida para darme lo mejor, por apoyarme en todo momento (incluso en la adolescencia...), sin vosotros no hubiera sido posible todo esto, os quiero. A mi sis, porque eres mi persona favorita, por aguantar las chapas mortales (y a veces pedir más!!), por los musicales de Disney, por ser mi mejor amiga desde los 13 años.

A mi tío Jose, porque me metí en esto por tu culpa, y aunque nunca me cuentas tus experimentos, me preguntas a mí por los míos. A mi tío Antonio por darme la visión práctica de las cosas y normalmente un punto de vista distinto al mío y todo esto con tu sarcasmo maravilloso que me encanta. A mi abuelito, que si lee esto, llorará muchísimo y a mi abuelita, que ojalá lo pudiera leer.

De igual manera resulta absolutamente imprescindible agradecer a todos aquellos que han estado conmigo estos años, y que no pertenecen al árbol genealógico.

A mis amigas, Laura, Patty, Paula, Chiki, Ana, Merry y Elvira (tantos años amigas), por estar siempre conmigo y porque lleváis 1 año y medio escuchando la misma frase “cuando acabe la tesis...” Gracias porque con vosotras las penas parecen menos, sois mi apoyo y mi terapia, mis amigas y mis psicólogas y sin vosotras hay veces que me hubiera derrumbado. Las penas con cañas y amigas, son menos penas.

A Noe, también te hago un apartado porque te echo mucho de menos, me acuerdo de ti muchísimo y me has animado un montón de veces aunque sea con tu famosa frase “deja de llorar ya”. Te admiro como científica y como persona.

Álvaro, Raúl, Patty (otra vez), Tere (otra vez), porque desde la carrera hemos estado juntos y esos años forjaron algo que aún se mantiene, y que todavía hacemos que dure. También incluyo aquí a los no-biólogos Luis, Miguel, Willy, Álvaro, Carlos, Juanjo. Desde las primeras vacaciones juntos, viajes varios, ese Sing-Star (aquí destaco a mi Álvaro y a Luis), los regalos boomerang que le hacemos a Álvaro para la Play, los cumpleaños con el trivial...Tantas cosas que se me olvidan. Os quiero amigos.

Los amigos EOI, Alex, Héctor, M.J (por tu fuerza interior, el taper emocional...), Luz y recientemente Sara, que me han aguantado un montón de veces lo de “vámonos de cañas que vaya día he tenido” y siguen ahí al pie del cañón! Gracias por vuestro apoyo.

Y por último, pero obviamente no menos importante, te quiero agradecer a ti Fermín, por ser mi media langosta, por darme fuerzas, por saber todo lo que quiero antes de que yo lo sepa. Por las risas, por lo sumamente bien que me lo paso contigo, por aguantarme en plan Frigel-Rock, por contar conmigo para todo, por quererme con mis despistes y mis olvidos. Por ver la tele conmigo en mi lengua materna. Por inventarte nombres nuevos todas las semanas. Por que estar contigo me hace mejor persona. Porque en toda mi vida pensé que iba a tener la suerte de enamorarme de mi mejor amigo, y ahora nos casamos, y quiero agarrarte del dedo cuando haga calor durante 60 años.

Abreviatura	Significado
AcMo	Anticuerpo monoclonal
APC	"antigen presenting cell" (célula presentadora de antígeno)
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	"Cluster" o grupo de diferenciación
CMV	Citomegalovirus
DC	"Dendritic cell" (célula dendrítica)
DICT ₅₀	Dosis infectiva en cultivo celular 50
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O.	Densidad óptica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	"Forward scatter" (tamaño celular)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófago)
HRP	Peroxidasade rábano picante
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	"Inducible nitric oxid sintase" (sintasa de oxido nítrico inducible)
LPS	Lipopolisacárido
MHC	"major histocompatibility complex" (complejo principal de histocompatibilidad)
MIF	Media de intensidad de fluorescencia
MOI	Multiplicidad de infección
PBS	Tampón fosfato salino
PBMC	"Peripheral blood mononuclear cells" (Células mononucleares sanguíneas)
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinina clorofila
P.I.	Post-infección
RaM	Suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón
RaM-FITC	Suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína
RaM-PE	Suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con ficoeritrina
RaM-HRP	Suero de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con peroxidasa
SFB	Suero fetal bovino
SLA	"Swine leukocyte antigen" (molécula de histocompatibilidad porcina)
SC	Suero de Cerdo
SWC	"Swine Workshop cluster" (grupo de diferenciación porcino)
SSC	Side scatter (complejidad celular)
TA	Temperatura Ambiente
T _{AN}	Temperatura de anillamiento o hibridación
TC	Tampón citometría
TF	Tampón fijación
TNF	"Tumor necrosis factor" (factor necrosante de tumor)
TS	Tampón de separación
VSRRP	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
WB	Western-blot

Solución	Composición
DMEM completo	DMEM, 5% de SFB, L-glutamina 2 mM, 50 µg/ml de gentamicina.
ELISA lavado	PBS, 0,5% tween 20.
ELISA Bloqueo	PBS, 1% BSA.
ELISA diluyente	PBS, 0,1% BSA, 0,01% tween 20
Medio LB	Bactotripton 5 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, NaCl 5 g/l
Medio Migración	RPMI, 1% BSA y HEPES 25 mM
Medio SOC	Bactotripton 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, NaCl 0,5 g/l, 4 ml de glicerol /l, KCl 2,5 mM, MgCl ₂ 2mM
RPMI completo	RPMI 1640, 10% SFB, L-glutamina 2mM, β-mercaptoetanol 5 X 10 ⁻⁵ M, 50 µg/ml de gentamicina
TAE 1X	Tris Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM
Tampón de carga 10X	Ficoll 400 20%, EDTA 100mM, 0,025% Orange G
Tampón de elución	Glicina-HCl 0,1M pH 2,7
Tampón de unión	Fosfato sódico 20 mM pH 7
Tampón de lisis	Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NP40 1%, pH 7,4, 1 mg/ml de BSA, PMSF 1mM y 10 µg/ml de aprotinina
Tampón de transferencia	Tris HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM y 20% de Metanol
Tampón citometría (TC)	PBS, 0,1% BSA, 0,01% azida sódica.
Tampón fijación (TF)	0,1% Formaldehído
Tampón separación (TS)	PBS, 5% SFB, 0,1% Azida, 2,5 mM EDTA
WB Tampón bloqueo	PBS, 3% BSA, 0,2% tween 20
WB Tampón lavado	PBS, 1% BSA, 0,2% tween 20

● INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERACION DE LA RESPUESTA INMUNE.....	1
1.1 Captura y presentación de antígenos por células presentadoras de antígeno (APC).....	2
2. MONOCITOS.....	3
2.1 Ontogenia de los monocitos.....	4
2.2 Migración de los monocitos.....	6
2.3 Antígenos para el estudio del linaje mieloide en cerdo.....	7
2.3.1. SWC3/CD172a.....	8
2.3.2. CD14.....	8
2.3.3 CD163.....	9
2.4 Heterogeneidad de los monocitos humanos y murinos.....	10
2.5 Heterogeneidad de los monocitos porcinos.....	12
2.6 Papel de los monocitos en la respuesta inmune innata....	14
2.7 Papel de los monocitos en la respuesta inmune adaptativa.....	16
3. LINFOCITOS T PORCINOS.....	16
4. QUIMIOQUINAS.....	18
4.1 Papel no quimiotáctico de las quimioquinas.....	22
4.2 Receptores de quimioquinas y mecanismos moleculares de transducción de señales.....	22
4.3 Quimioquinas utilizadas en esta tesis.....	23
4.3.1 CXCL12 y su receptor CXCR4.....	24
4.3.2 CCL19, CCL21 y su receptor CCR7.....	25
4.3.3 CCL2 y su receptor CCR2.....	26
5. EL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (SRRP).....	27
5.1 Clasificación taxonómica.....	28
5.2 Organización genómica y proteica.....	28
5.3 Tropismo viral y mediadores de la entrada del virus.....	29
5.4 Respuesta inmune.....	30
5.5 Vacunación frente al virus de SRRP.....	30
5.6 Nuevas estrategias de vacunación.....	32
6. VACUNAS DE DNA Y QUIMIOQUINAS COMO ADYUVANTES.....	33
● OBJETIVOS.....	36
● MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. ANIMALES.....	37
2. CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES.....	37
2.1 Células mononucleares sanguíneas (PBMC).....	37
2.2 Líneas celulares.....	38

3. ANTICUERPOS.....	38
3.1 Producción de los sobrenadantes de cultivo.....	39
3.2 Cuantificación de los anticuerpos presentes en el sobrenadante de cultivo por ELISA.....	40
3.3 Purificación de AcMo.....	40
3.4 Marcaje de los AcMo.....	41
3.4.1 Marcaje con Biotina.....	41
3.4.2 Marcaje con fluorocromos.....	41
4 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	41
4.1 Análisis de las células con un solo color.....	41
4.2 Análisis de las células con varios colores.....	42
4.3 Adquisición de células en el citómetro y análisis de los resultados.....	42
5 SEPARACIÓN MAGNÉTICA DE POBLACIONES CELULARES.....	43
5.1 Monocitos.....	43
5.2 Separación de la población CD14 ⁺ SLA-II ⁻ CD163 ⁻	43
5.3 Separación de la población CD14 ⁻ SLA-II ⁺ CD163 ⁺	44
6 VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (VSRRP).....	45
6.1 Producción del virus del SRRP.....	46
6.2 Titulación del virus del SRRP.....	46
7 PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN.....	46
7.1 Extracción de RNA.....	46
7.2 Obtención de cDNA.....	47
7.3 Amplificación de la secuencia de nucleótidos que codifica las quimioquinas porcinas CCL2 y CCL19 y el receptor CCR7 (PCRs).....	47
7.3.1 CCL2.....	47
7.3.2 CCL19.....	48
7.3.3 CCR7.....	49
7.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	49
7.5 Extracción de DNA desde geles de agarosa.....	50
7.6 Plásmidos.....	50
7.7 Digestión.....	52
7.8 Ligación.....	52
7.9 Transformación de bacterias competentes.....	52
7.9.1 Selección de colonias.....	53
7.9.2 Extracción y purificación de plásmidos.....	53
7.9.3 Secuenciación.....	54
7.10 Obtención de los clones que expresan de forma estable las proteínas de fusión.....	54
7.11 Western-blot y Dot-blot.....	55
7.12 Inmunofluorescencia.....	56
7.13 Migración celular.....	57
7.14 Purificación de las proteínas de fusión con Fc.....	58
7.15 Cuantificación de las quimioquinas-Fc.....	58

8	ESTUDIO IN VIVO.....	59
8.1	Estudio del efecto adyuvante de CCL2 en vacunas DNA.....	59
8.2	Análisis de la proliferación de linfocitos T de los cerdos vacunados....	59
8.3	Estudio de la respuesta humoral.....	60
9	DETECCIÓN POR RT-PCR DE LA EXPRESIÓN RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS.....	60
10	UNIÓN DE LAS QUIMIOQUINAS A LOS RECEPTORES.....	62
10.1	Unión de CCL2-GFP.....	62
10.2	Unión de CCL19-Fc.....	63
●	RESULTADOS.....	64
1.	EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS.....	64
1.1	Separación de las poblaciones CD14 ^{alt} SLA-II ⁻ CD163 ⁻ y CD14 ⁻ SLA-II ⁺ CD163 ⁺	64
1.2	Análisis por RT-PCR de los genes de receptores de quimioquinas en las poblaciones CD14 ^{alt} SLA-II ⁻ CD163 ⁻ y CD14 ⁻ SLA-II ⁺ CD163 ⁺ de monocitos.	68
2	ESTUDIO DE LA UNIÓN DE QUIMIOQUINAS PORCINAS A LAS SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS.....	70
2.1	CCL2.....	70
2.1.1	Clonación de CCL2.....	70
2.1.2	Expresión de CCL2.....	71
2.1.3	Funcionalidad y especificidad de CCL2.....	73
2.1.4	Respuesta de subpoblaciones de monocitos a CCL2.....	75
2.1.5	Unión de CCL2 a las subpoblaciones de monocitos.....	77
2.2	CCL19 y CCL21.....	79
2.2.1	Clonaje de CCL19 y CCL21.....	79
2.2.2	Expresión de CCL19 y CCL21.....	80
2.2.3	Funcionalidad.....	81
2.2.4	Respuesta de subpoblaciones de monocitos a CCL19 y CCL21.....	82
2.2.5	Unión de las proteínas recombinantes CCL19 y CCL21 a PBMC.....	83
2.2.6	Clonación de CCL19-Fc.....	84
2.2.7	Expresión y funcionalidad de CCL19-Fc.....	86
2.2.8	Purificación de CCL19-Fc.....	89
2.2.8.1.	Columnas de proteína A.....	89
2.2.8.2	Identificación de las células a las que se une CCL19-Fc.....	93
2.2.8.3	Columnas de anticuerpos monovalentes que reconocen la porción Fc de IgG humana.....	94
2.2.9	Unión de CCL19-Fc a las subpoblaciones de monocitos.....	98

3	RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA DE LINFOCITOS A LOS LIGANDOS DE CCR7. UNIÓN DE CCL19-Fc.....	99
	3.1 Respuesta quimiotáctica de linfocitos a las quimioquinas CCL19 y CCL21.....	99
	3.2 Unión de CCL19-Fc a PBMC.....	102
4	EVALUACIÓN DEL EFECTO ADYUVANTE DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN UN MODELO DE INMUNIZACIÓN CON DNA.....	105
	4.1 Modelo experimental.....	105
	4.2 Detección de la respuesta humoral.....	106
	4.3 Proliferación.....	108
●	DISCUSIÓN.....	109
●	CONCLUSIONES.....	128
●	BIBLIOGRAFÍA.....	130
●	PUBLICACIONES	

INTRODUCCIÓN

1. GENERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Las células y las moléculas del sistema inmune trabajan como un sistema de defensa integrado para eliminar o controlar los agentes infecciosos (Abbas, AK et al. 2006). Existe una gran variedad de patógenos con los que el sistema inmune se puede encontrar. Los mecanismos de inmunidad innata ejercen su acción en las fases más tempranas de una infección y pueden tener éxito en su eliminación. Sin embargo, los patógenos han desarrollado estrategias que les permiten eludir o superar estos mecanismos innatos y establecer un foco de infección desde el que expandirse. En estas circunstancias, la respuesta inmune innata fija el escenario para la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Se requieren varios días para la expansión clonal y la diferenciación de los linfocitos *naïve* hacia células T efectoras y células B productoras de anticuerpos, que consiguen la eliminación del patógeno en la mayoría de los casos (Garcia, S et al. 1999). Durante este periodo, también se establece la memoria inmunológica específica, que asegura la reinducción rápida de anticuerpos específicos y de células T efectoras en encuentros posteriores con el mismo patógeno, proporcionando así una protección de larga duración frente a una infección determinada (McKee, AS et al. 2010).

La inmunidad innata es un requisito esencial para la respuesta inmune adaptativa. En este sentido, los linfocitos específicos son activados por moléculas coestimuladoras producidas por células del sistema inmune innato durante su interacción con los microorganismos; y también las citoquinas producidas durante estas fases tempranas tienen un papel importante en la generación de la posterior respuesta adaptativa. Las diferentes fases de la defensa frente a un antígeno están organizadas en el espacio y el tiempo. Se producen cambios en las moléculas especializadas de la superficie celular y existen quimioquinas que guían a los linfocitos al lugar apropiado de acción en los diferentes escenarios de la respuesta inmune (Abbas, AK et al. 2006).

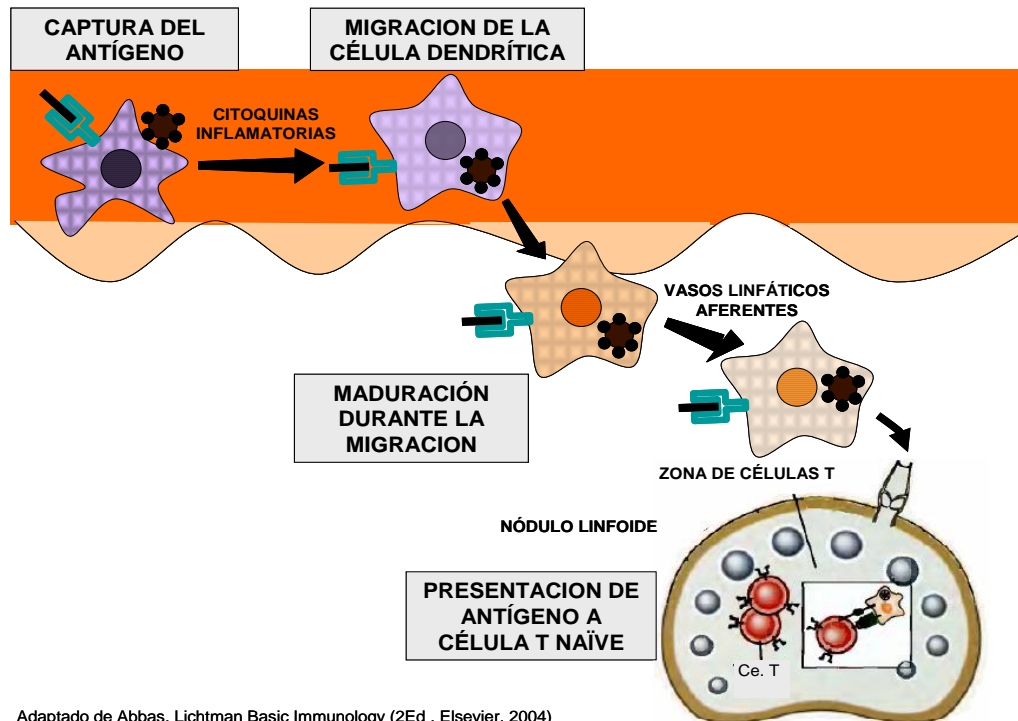
1.1 Captura y presentación de antígenos por células presentadoras de antígeno (APC)

Los microorganismos penetran en el organismo, principalmente a través de la piel (por heridas), el tracto gastrointestinal (por ingestión) y el tracto respiratorio (por inhalación). La piel actúa de barrera física frente a las infecciones. Cuenta con una población profesional de APCs que pertenecen al linaje de las células dendríticas. Estas células dendríticas se consideran inmaduras, dado que no son capaces todavía de estimular a los linfocitos T (Abbas, AK et al. 2006; Mellman, I et al. 2001). Pueden producir quimioquinas inflamatorias en respuesta a diferentes estímulos: tras su estimulación con LPS, TNF- α o CD40L, expresan rápidamente y de manera transitoria CCL3, CCL4 y CXCL8, mientras que los niveles de expresión de CCL2, CCL8, CXCL10 y CCL5 se mantienen durante más tiempo. Esta producción de quimioquinas por las células dendríticas tiene lugar cuando éstas se encuentran aún en los tejidos periféricos, y contribuye al reclutamiento de otras APCs (células dendríticas inmaduras o sus precursores) o de células efectoras, como macrófagos, granulocitos y células T (Banchereau, J et al. 2000).

Las APCs capturan los antígenos por un proceso de fagocitosis (para antígenos particulados) o pinocitosis (para antígenos solubles) (Sallusto, F et al. 1995; Steinman, RM et al. 2010). Las citoquinas como TNF- α e IL-1 actúan sobre las DCs, que pierden su adhesión al epitelio y pueden migrar con su carga antigénica (Figura 1) (Abbas, AK et al. 2006). En este proceso de migración, las células dendríticas maduran y se convierten en APC capaces de estimular a los linfocitos T. Durante la migración se producen diversos cambios en estas células dendríticas: pérdida de los receptores de fagocitosis y endocitosis, aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD58, CD80, CD86), y cambios de su morfología celular y de sus lisosomas (Mellman, I et al. 2001). Asimismo se produce la expresión de CCR7, de manera que las células dendríticas adquieren la capacidad de responder a CCL21 y CCL19, ligandos de CCR7, producidos en los ganglios linfáticos. Todos estos cambios hacen que las células dendríticas migren desde los tejidos hasta las áreas T de los ganglios linfáticos (Luster, AD 2002).

Las APCs son capaces de presentar los antígenos procesados, tanto a células T CD8⁺, asociados a MHC-I, como a linfocitos T CD4⁺, en cuyo caso lo hacen a través

del MHC-II, dando lugar a la inducción de la respuesta citotóxica o cooperadora respectivamente (Dudziak, D et al. 2007). Además de activar a los linfocitos T, las APCs pueden actuar sobre las células B, tanto *naïve* como de memoria.



Adaptado de Abbas, Lichtman Basic Immunology (2Ed , Elsevier, 2004)

Figura 1. Captura y presentación del antígeno por células presentadoras de antígeno.

2. MONOCITOS

Los monocitos son leucocitos sanguíneos circulantes que representan alrededor del 10% de los leucocitos de la sangre humana y del 4% de los de la sangre de ratón (Auffray, C et al. 2009). Se distinguen tanto de las células polimorfonucleares y de las células natural killer (NK), que también pertenecen a la rama innata del sistema inmune, como de los linfocitos B y linfocitos T, que representan la rama adaptativa del sistema inmune (Chen, G et al. 2007). En mamíferos, los monocitos son células accesorias, que pueden vincular la inflamación y la defensa innata frente a un patógeno con la respuesta inmune adaptativa (Auffray, C et al. 2009). La función más conocida de los monocitos es como reservorio sistémico de precursores mieloides para la renovación de macrófagos tisulares y de células dendríticas (Serbina, NV et al. 2006). Sin embargo, no se les puede considerar como meros precursores de células dendríticas, ya que también parecen ejercer importantes efectos en la expansión y polarización de los linfocitos T (Geissmann, F et al. 2008; Randolph, GJ et al. 2008).

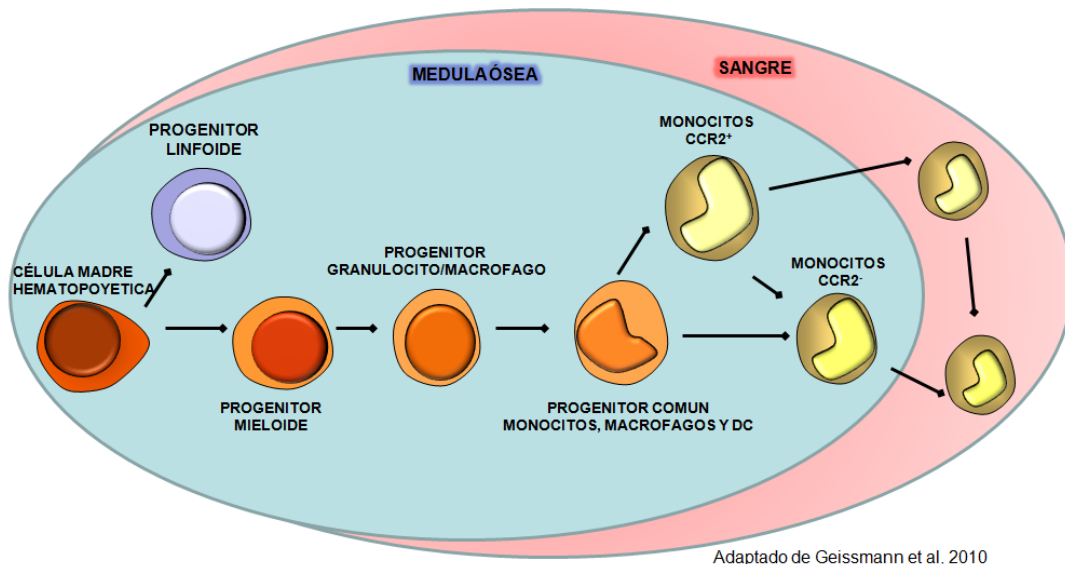
Los monocitos representan células inmunes efectoras. En condiciones homeostáticas y en procesos inflamatorios los monocitos constituyen una reserva de células efectoras potenciales y de células *scavenger* en los vasos sanguíneos (Auffray, C et al. 2007). Están equipados con numerosos receptores de quimioquinas y receptores que reconocen microorganismos, lípidos y células apoptóticas (Swirski, FK et al. 2009). Cuando son estimulados pueden producir moléculas efectoras implicadas en la defensa ante patógenos (Strauss-Ayali, D et al. 2007) y en la patogénesis de numerosas enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis y la aterosclerosis (Libby, P et al. 2008). El estudio de la biología de los monocitos es útil para la comprensión de la susceptibilidad a enfermedades, pero además puede ser importante para proporcionar ideas y herramientas para el control, retraso o mitigación de los efectos secundarios perjudiciales de la respuesta inflamatoria (Gautier, EL et al. 2009).

2.1 Ontogenia de los monocitos

Los monocitos se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas de la médula ósea a través de varios pasos. En cada uno de estos pasos se deciden opciones con las que la célula se va comprometiendo hacia su destino y que, por lo tanto, suponen una pérdida de su potencial de desarrollo. El modelo admitido actualmente consta de los siguientes estadios: progenitor mieloide común; progenitor de colonias granulocito/macrófago; progenitor de monocito/macrófago/DCs y finalmente dos tipos de monocitos (CCR2⁺ y CCR2⁻) que dejan la médula ósea y pasan a la sangre (Figura 2) (Geissmann, F et al. 2010).

La célula progenitora bipotencial mieloide se identifica *in vitro* por su capacidad de formar colonias de granulocitos/macrófagos (Metcalf, D et al. 1982). Esta célula tiene por lo tanto capacidad para diferenciarse hacia el linaje granulocítico o hacia el linaje monocito/macrófago, dependiendo de los factores presentes en su entorno, así como de la expresión de los receptores apropiados que reconocen esos factores. El desarrollo de los monocitos sanguíneos depende del factor de crecimiento hematopoyético CSF-M. Su receptor CSF-1R se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas y los precursores de todas estas células, que constituyen lo que se ha llamado clásicamente Sistema mononuclear fagocítico

(Sasmono, RT et al. 2003). Otras citoquinas como GM-CSF, flt-3 y linfotóxina $\alpha 1\beta 2$, controlan el desarrollo y la homeostasis de los macrófagos y células dendríticas, pero no parecen ser indispensables para el desarrollo de los monocitos (Abboud, CN et al. 1995; Geissmann, F et al. 2010).



Adaptado de Geissmann et al, 2010

Figura 2. Esquema de la ontogenia de los monocitos/macrófagos

Massberg et al. han demostrado que las células madre hematopoyéticas pueden circular y proliferar dentro de tejidos extramedulares y dar lugar a células mieloides, preferentemente células dendríticas. La diferenciación de estas células madre es estimulada por la exposición a algunos agonistas de los receptores TLR (*toll-like receptor*), como por ejemplo el LPS (Massberg, S et al. 2007). Los receptores TLR constituyen una familia de moléculas que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (Beutler, B et al. 2006).

El sistema mononuclear fagocítico no puede ser considerado como una simple familia de células derivadas de los monocitos, sino como un sistema celular complejo que está implicado en la eliminación de células muertas, patógenos y moléculas, por medio de una variedad de procesos celulares, como la fagocitosis y la endocitosis. La contribución de los monocitos a este complejo sistema celular es un área de investigación muy activa.

2.2 Migración de los monocitos.

Durante la inflamación, las quimioquinas dirigen la migración de los monocitos circulantes a los tejidos, donde se transforman en macrófagos; además regulan el mecanismo de activación de los monocitos.

En estudios realizados por el grupo de Van Furth en los años 60 se demostró que la mitad de los monocitos circulantes dejan diariamente la circulación sanguínea, y entran en los tejidos del cuerpo, donde se diferencian en macrófagos (Van Furth, R et al. 1968). Un aspecto fundamental del tráfico leucocitario es la transición continua entre la circulación sanguínea y los tejidos. El endotelio vascular representa el punto de contacto entre estos dos compartimentos, sirviendo a la vez de barrera para el tráfico leucocitario y de asistente en la adhesión y migración de las células (Kamei, M et al. 2010). El paso a través del endotelio (conocido como diapédesis) y la extravasación son puntos críticos de la migración de los leucocitos.

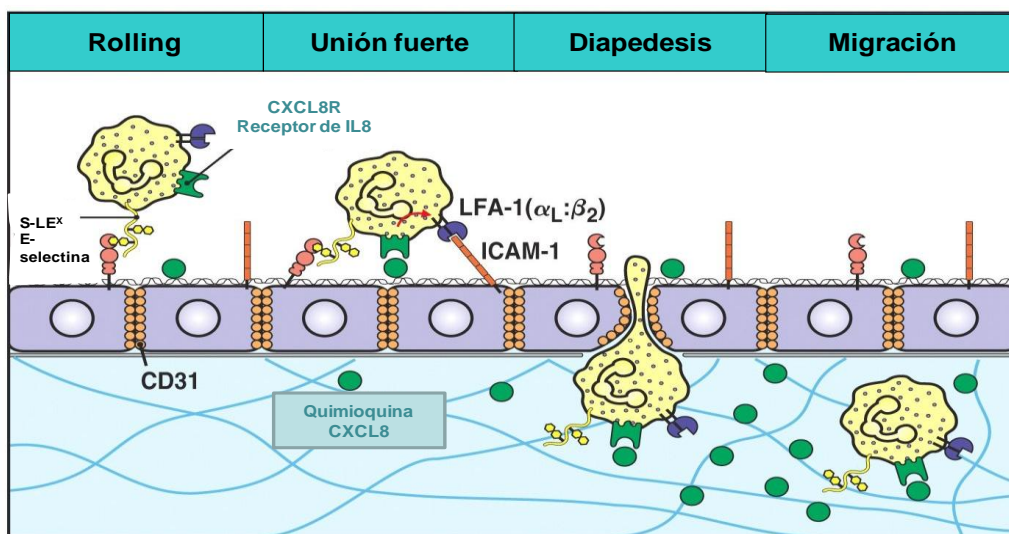


Figura 3. Esquema de la migración de los leucocitos.

La extravasación se puede definir como un proceso de varios pasos (Figura 3). Comienza con la acumulación de leucocitos circulantes en la superficie luminal del endotelio por medio de la clásica cascada de adhesión y activación. En primer lugar se producen interacciones lábiles entre los leucocitos y el endotelio vascular, que permiten a aquellos disminuir su velocidad y facilitan que puedan establecerse contactos más estables. Posteriormente el leucocito comienza a rodar por la superficie del endotelio, proceso denominado *rolling*. Las moléculas de adhesión

que tienen el papel más importante en este momento son las selectinas, que facilitan la interacción y la respuesta a las quimioquinas presentes en la superficie del endotelio (Imhof, BA et al. 2004).

En el siguiente paso se producen interacciones firmes entre los receptores de integrinas de los leucocitos (LFA-1, Mac-1 y VLA-4, etc.) con sus ligandos endoteliales (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, etc.). Así, el leucocito queda retenido en el endotelio. En esta fase juegan un papel importante las quimioquinas que en la luz del vaso sanguíneo son retenidas por glucosaminoglicanos de la superficie endotelial y de este modo quedan accesibles para interaccionar con sus receptores, presentes en los leucocitos. A continuación, debido a la firme adhesión, la señalización activada por las integrinas y la presencia de quimioquinas (como CCL19 y CCL21), los leucocitos sufren cambios morfológicos y comienzan a migrar de forma lateral por la superficie del endotelio. Esta actividad parece que les permite buscar un lugar permisivo para la extravasación (Kamei, M et al. 2010). La extravasación de las células se realiza finalmente siguiendo un gradiente quimioatrayente generado por las quimioquinas. El gradiente y la participación de proteasas hace que los leucocitos atraviesen el endotelio y se dirijan al sitio de inflamación o al lugar que deben ocupar dentro del órgano correspondiente (Abbas, AK et al. 2006).

2.3 Antígenos para el estudio del linaje mieloide en el cerdo

La diferenciación de los monocitos y macrófagos va acompañada de la adquisición de antígenos de superficie, que se relacionan con la función de estas células. Los marcadores de superficie, definidos mediante AcMo, han proporcionado un gran impulso a la caracterización de diferentes subpoblaciones de células mielomonocíticas y han permitido la definición de tipos celulares diferentes, el análisis de su heterogeneidad y el estudio de los linajes de diferenciación. El número de marcadores bien caracterizados para el estudio del linaje mieloide es en el cerdo mucho menor que en las especies murina y humana. Sin embargo es suficiente para desvelar muchos aspectos de la biología de estas células (Ezquerro, A et al. 2009). En esta tesis nos centraremos especialmente en

ciertos marcadores mielomonocíticos porcinos y posteriormente revisaremos la heterogeneidad de los monocitos en base a dichos marcadores.

2.3.1 SWC3/CD172a

SWC3 fue el primer marcador mielomonocítico porcino establecido (Blecha, F et al. 1994). Desde su obtención y definición oficial se ha utilizado como el principal marcador de células mieloides en la especie porcina. La expresión de SWC3 aparece en los precursores mielomonocíticos más tempranos y su expresión se mantiene a lo largo de la diferenciación de estas células (Summerfield, A et al. 1997). SWC3 ha sido identificado como el homólogo porcino de CD172a o SIRP α (Alvarez, B et al. 2000), un miembro de las SIRP (*Signal-regulatory proteins*), una familia de glicoproteínas transmembrana que están implicadas en la transducción de señales. Las SIRP se expresan en las células mieloides, incluyendo macrófagos, monocitos, granulocitos y células dendríticas (Van Beek, EM et al. 2005). Considerando la aparición temprana de CD172a en la ontogenia de las células mieloides, se ha propuesto su implicación en el control de la proliferación, diferenciación y activación de estas células (Ezquerro, A et al. 2009).

2.3.2 CD14

Es uno de los marcadores mieloides mejor caracterizados, debido a que es un componente importante en la inmunidad innata. En cerdo, la identificación de este marcador se realizó al principio con anticuerpos anti-CD14 humanos que reaccionaban de forma cruzada con la especie porcina. Sin embargo, posteriormente se han desarrollado anticuerpos específicos frente al CD14 porcino. Los distintos anticuerpos que reconocen CD14 muestran diferencias en los patrones de marcaje. Si estas diferencias son debidas a las distintas afinidades de los anticuerpos o al reconocimiento por parte de estos de diferentes formas de la molécula, todavía no se ha aclarado. CD14 ha sido considerado como un marcador típico de monocitos y macrófagos, sin embargo su expresión no está restringida a las células mieloides (Dominguez, J et al. 1998; Sanz, G et al. 2007).

El CD14 porcino ha sido clonado. Es una glicoproteína ligada a la membrana con un dominio extracelular que contiene 11 repeticiones ricas en leucina (Petersen, CB et al. 2007; Qiu, XT et al. 2007; Sanz, G et al. 2007).

Se ha descrito que, en el humano, CD14 es parte del complejo receptor de LPS, del que también forma parte el receptor TLR4 y otras proteínas (Triantafilou, M et al. 2002). Además de a LPS el CD14 se une también a otros productos bacterianos (entre ellos peptidoglicanos y ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas), glicolípidos micobacterianos y manosas de levaduras (Cleveland, MG et al. 1996; Savedra, R, Jr. et al. 1996; Tada, H et al. 2002). La interacción de cualquiera de estos ligandos con el complejo CD14 produce la transducción de señales a través de los TLRs, lo que induce la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras. Además se ha demostrado que CD14 juega un papel en el reconocimiento y la fagocitosis de células que sufren apoptosis (Gregory, CD 2000).

2.3.3 CD163

El receptor CD163 es un miembro de la superfamilia de proteínas SRCR (*Scavenger receptors cystein-rich*). Esta familia contiene un gran número de proteínas de membrana implicadas en el reconocimiento de varios ligandos (proteínas, polisacáridos y lípidos) (Sarrias, MR et al. 2004). CD163, cuya expresión está restringida a monocitos y macrófagos, ha sido importante para el estudio de la heterogeneidad de los monocitos y los macrófagos porcinos (Pérez C et al. 2008). Su DNA codificante muestra una gran conservación con otras especies. El CD163 humano se ha demostrado que funciona como un receptor para complejos hemoglobina/haptoglobina (Kristiansen, M et al. 2001). La señalización a través de CD163 conduce a la producción de proteínas, tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. La expresión del CD163 humano aumenta con la activación de TLRs como el 2 y el 5, y esta activación también incrementa la producción de IL-6 e IL-10. Por otro lado, el IFN- γ suprime la producción de IL-10 y regula negativamente la expresión de CD163 (Weaver, LK et al. 2007). Actualmente se piensa que CD163 está implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la eliminación de la haptoglobina y hemoglobina de la sangre (Graversen, JH et al. 2002). En células

humanas, el CD163 interacciona con bacterias actuando como un sensor en los procesos infecciosos (Fabriek, BO et al. 2005).

Un aspecto interesante de CD163 es que la porción extracelular de su molécula puede liberarse de la superficie de los monocitos y los macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios, mediante un mecanismo dependiente de proteasas (Fabriek, BO et al. 2005). El interés de esta molécula en la especie porcina ha aumentado por el hecho de estar implicada en la infección de los macrófagos porcinos por dos virus que son importantes desde el punto de vista económico, el virus de la peste porcina africana (PPA) y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (VSRRP) (Calvert, JG et al. 2007; Sanchez-Torres, C et al. 2003; Welch, SK et al. 2010).

2.4 Heterogeneidad de los monocitos humanos y murinos

Los monocitos sanguíneos se dividen en varias subpoblaciones que difieren en morfología y funcionalidad. De acuerdo a la expresión de distintos marcadores de superficie, se han descrito dos poblaciones mayoritarias de monocitos sanguíneos en humano, ratón y otras especies como rata y cerdo (Chamorro, S et al. 2000; Geissmann, F et al. 2003; Ondrackova, P et al. 2010; Ziegler-Heitbrock, HW et al. 1993). Estas dos poblaciones se pueden distinguir en humano y ratón por diferentes patrones de expresión de receptores de quimioquinas, especialmente CCR2 y CX₃CR1 y también por otros marcadores de superficie, como CD14.

La variada terminología usada para definir a las poblaciones murinas y sus análogas en humanos es confusa, haciendo referencias a diferentes combinaciones de marcadores de superficie para diferentes especies y con términos como “monocitos inflamatorios”, que no se refieren a la misma subpoblación en humano y en ratón. Esto es debido a que los monocitos en humanos fueron caracterizados inicialmente por la expresión de CD14 y CD16 y sin embargo la caracterización de los monocitos murinos se realizó de acuerdo a la expresión del receptor de quimioquinas CCR2 y del marcador Ly-6C. Para resolver esto, un grupo de expertos ha propuesto recientemente una nomenclatura bajo el patrocinio de la Unión internacional de sociedades de inmunología (IUIS) y la Organización

mundial de la salud. Así podemos dividir a los monocitos en “clásicos”, “no-clásicos” e “intermedios” (Ziegler-Heitbrock, L et al. 2010).

Los monocitos “clásicos” están definidos en la especie humana como células $CD14^{alt}CD16^{-}$ que son capaces de producir tanto $TNF-\alpha$ como IL-10 y muestran mayor capacidad de fagocitosis y de producir especies reactivas de oxígeno que los otros monocitos. Los monocitos “no clásicos” humanos $CD14^{+}CD16^{+}$ presentan un fenotipo más parecido al de los macrófagos tisulares, expresan $TNF-\alpha$ en grandes cantidades, pero no expresan IL-10 o lo hacen en pequeñas cantidades, y muestran mayor capacidad para presentar antígeno. Los monocitos humanos $CD14^{alt}CD16^{-}$ expresan CCR2 y CD62L, mientras que los monocitos $CD14^{+}CD16^{+}$ expresan el receptor de quimioquinas CCR5 y niveles mayores del CX_3CR1 , y son $CD62L^{-}$ (Gordon, S et al. 2005; Serbina, NV et al. 2008).

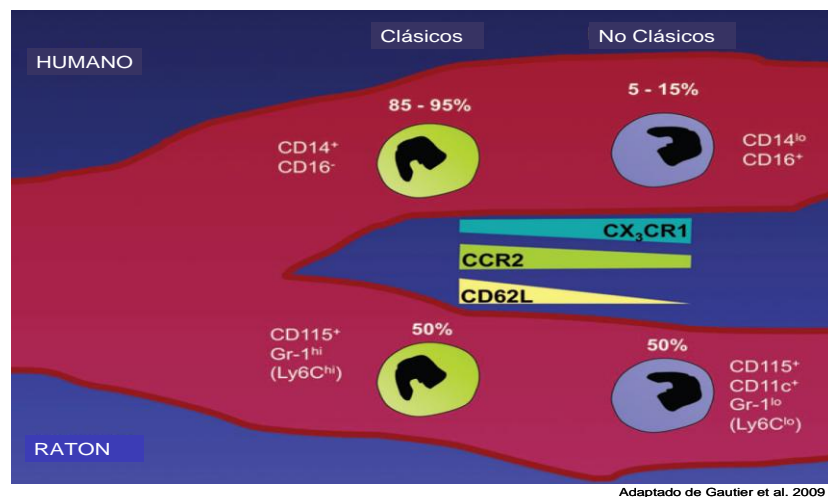


Figura 4. Esquema de las poblaciones humanas y murinas de monocitos

Por lo que respecta al ratón, los monocitos “clásicos” expresan Ly-6C/Gr-1, el receptor de quimioquinas CCR2 y la molécula de adhesión CD62L o L-selectina. Estos monocitos se habían denominado “inflamatorios” porque son selectivamente reclutados hacia sitios de inflamación y ganglios linfáticos. La población “no clásica” de monocitos se había denominado previamente “residente” porque se encontraban en los tejidos, tanto en condiciones homeostáticas como inflamatorias. Esta población “no clásica” se caracteriza por un mayor tamaño, mayor expresión del receptor de quimioquinas CX_3CR1 y la ausencia de expresión de Ly-6C (o niveles bajos de la misma), CCR2 y L-selectina. Se ha propuesto que su papel es el de renovar a los macrófagos “residentes” de los tejidos y a la población de células

dendríticas (Geissmann, F et al. 2008; Taylor, PR et al. 2003). Para unificar términos, actualmente se denomina “clásicos” a los monocitos CCR2⁺. Es la población mayoritaria en humanos ($\geq 92\%$), y constituye la mitad en ratón. Presentan lógicamente la capacidad de responder a la quimioquina CCL2. Por el contrario, los monocitos a los que denominamos “no clásicos” no expresan CCR2, son CD14⁺CD16⁺ en humano, donde constituyen una proporción muy baja y son Ly-6C^{baj/-} en ratón (Figura 4)(Gautier, EL et al. 2009).

En ratón se ha identificado una población que expresa de forma intermedia Ly-6C y se ha propuesto una vía de diferenciación donde los monocitos Ly-6C⁻ CCR2⁻ derivarían de los monocitos Ly-6C⁺CCR2⁺ (Giordano, D et al. 2003). Esta población podría ser un estadio fenotípico intermedio entre las dos poblaciones mayoritarias. Esta subpoblación “intermedia” se ha analizado en humanos y presenta características de las dos poblaciones mayoritarias, tendiendo a expresar todos los receptores de quimioquinas que las distinguen, aunque expresando algunos receptores que no están presentes en ellas, como CCR7 y CCR8 (Ancuta, P et al. 2009). Aunque la población intermedia de monocitos es minoritaria en sangre, la amplia expresión de receptores de quimioquinas de que dispone hace que sean una población flexible que puede responder a diferentes estímulos quimiotácticos (Qu, C et al. 2004).

2.5 Heterogeneidad de los monocitos porcinos

En contraste con los monocitos humanos, la mayoría de los monocitos porcinos son CD16⁺. Los monocitos porcinos se pueden dividir en dos subpoblaciones de acuerdo con la expresión de CD163 (Chamorro, S et al. 2000). Algunas características de las células CD163⁺, como la baja expresión de CD14 y la alta expresión de SLA-II, son similares a las características de los monocitos “no clásicos” de humano y ratón. Los monocitos porcinos CD163⁺ expresan también niveles más altos de las moléculas de adhesión, como VLA-4 (CD49d/CD29) y LFA-1 (CD11a/CD18), y de moléculas coestimuladoras CD80/86, que los CD163⁻. Además, estos monocitos son buenos productores de TNF- α pero no de IL-10, y tienen buena capacidad presentadora de antígeno (Chamorro, S et al. 2005).

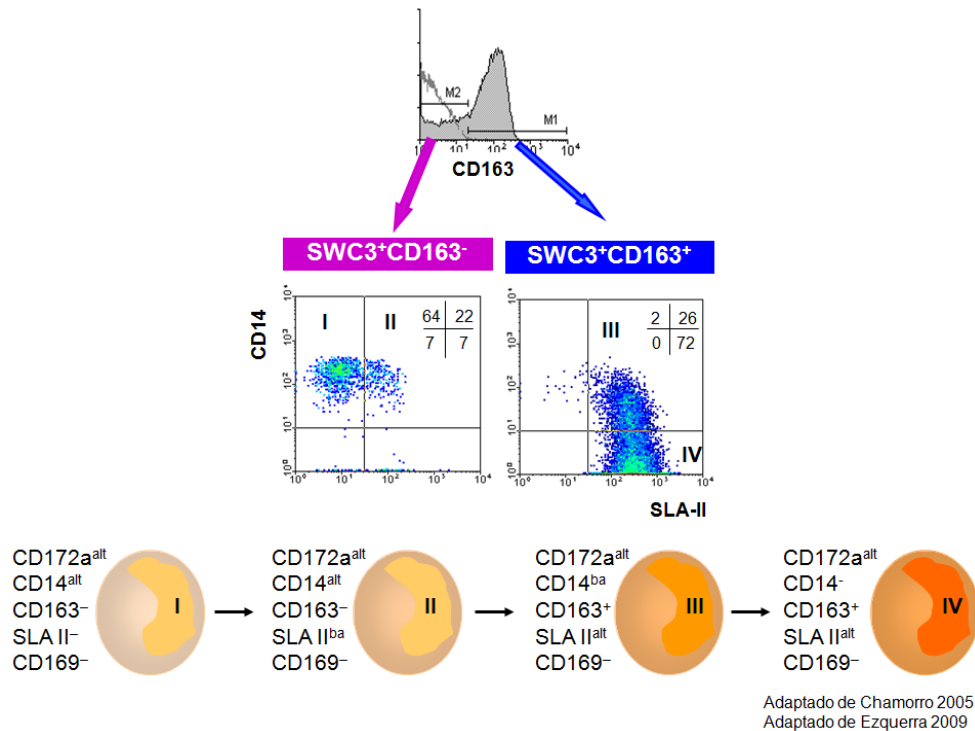


Figura 5. Esquema de las poblaciones de monocitos sanguíneos porcinos.

Tanto los monocitos $CD163^+$ como los $CD163^-$ pueden diferenciarse a células dendríticas cuando se cultivan con GM-CSF e IL-4. Sin embargo las DCs derivadas de monocitos $CD163^+$ parecen ser más eficientes en la presentación de antígenos, expresan mayores niveles de SLA-II y CD80/86 e inducen la proliferación de células T de forma más eficiente (Chamorro, S et al. 2004). Estos monocitos se pueden dividir a su vez según la expresión de SLA-II y CD14 (marcado con el anticuerpo Tük4) en cuatro poblaciones que parecen corresponder con etapas distintas de diferenciación: (I) $CD14^{alt}SLAII^-CD163^-$; (II) $CD14^{alt}SLAII^{ba}CD163^-$; (III) $CD14^{ba}SLAII^{alt}CD163^+$ y (IV) $CD14^-SLAII^{alt}CD163^+$ (Figura 5) (Chamorro, S et al. 2005).

Los estudios *in vitro* sugieren que los monocitos $CD163^+$ son una forma madura de los monocitos sanguíneos y pueden dar lugar a macrófagos tisulares y células dendríticas. Sin embargo, la función *in vivo* de las formas menos maduras de los monocitos sanguíneos, que en humanos y en ratón se cree que juegan un papel importante como precursores de macrófagos, es completamente desconocida en cerdo (Ondrackova, P et al. 2010).

2.6 Papel de los monocitos en la respuesta inmune innata

Se ha estudiado mucho la contribución que hacen los monocitos sanguíneos a la formación y abastecimiento de los órganos con macrófagos y células dendríticas. Geissmann y col. establecieron que los monocitos CCR2⁻CX₃CR1⁺ (los conocidos como “no clásicos”), los más maduros tanto en humano como en ratón, en condiciones homeostáticas migran a los tejidos, renovando la población de macrófagos tisulares (Geissmann, F et al. 2003).

Sin embargo, bajo condiciones inflamatorias, los monocitos CCR2⁺CX₃CR1^{baj} (monocitos “clásicos” o “inflamatorios”) son en general, los únicos que pueden migrar a los lugares de inflamación (Figura 6) (Tacke, F et al. 2006).

Tanto en humano como en ratón encontramos numerosos ejemplos del papel de los monocitos CCR2⁺ en la respuesta inmune innata frente a distintas infecciones. En infecciones microbianas, como la causada por *Listeria monocytogenes*, una bacteria intracelular, se induce la migración de monocitos hacia el sitio de la infección. Los monocitos CCR2⁺ son cruciales en las primeras 24 horas de la respuesta inmune (Czuprynski, CJ et al. 1994), debido a su capacidad bactericida basada en la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNIs) y oxígeno (ROIs) (Fang, FC 2004). Los ratones que carecen de CCR2⁺ son muy susceptibles a *L. monocytogenes* y sucumben a la infección en 4 días. Esto es debido a que estos ratones presentan niveles disminuidos de TNF e iNOS (*inducible nitric oxide sintase*) en los tejidos infectados (Serbina, NV et al. 2003).

En infecciones producidas por *Mycobacterium tuberculosis* en el ratón, los monocitos reclutados en el lugar de la infección son CCR2⁺ (Peters, W et al. 2004). Los ratones deficientes en CCR2 presentan una menor activación de células T en este tipo de infección y una reducción de las células CD4 productoras de IFN-γ (Peters, W et al. 2000). Los monocitos son necesarios para la protección cuando la carga bacteriana es muy alta, dado que los monocitos CCR2⁺ reclutados son una fuente de iNOS (Serbina, NV et al. 2008). En humanos no se sabe en qué medida participan los monocitos CCR2⁺ en la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, aunque sí se ha descrito la presencia de monocitos CCR2⁺ en lesiones de piel causadas por *M. leprae*.

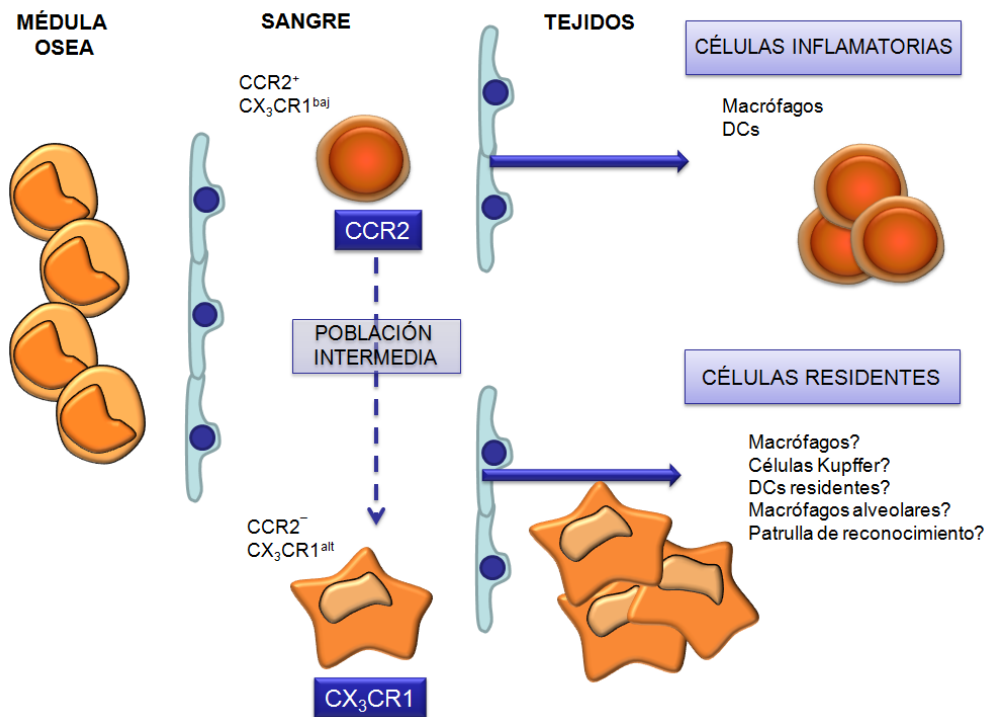


Figura 6. Papeles propuestos para las dos poblaciones mayoritarias de monocitos

También en infecciones producidas por protozoos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, que infecta a muchos mamíferos, entre ellos el hombre, se ha demostrado la importancia del CCR2. En un modelo murino de toxoplasmosis han demostrado que el reclutamiento de monocitos es fundamental para el control inicial de este patógeno, siendo por lo tanto los ratones deficientes en CCR2 más susceptibles a esta enfermedad (Robben, PM et al. 2005). Lo mismo se ha demostrado en el caso de infecciones fúngicas (Duong, M et al. 1998).

En condiciones inflamatorias sin patógenos implicados, se ha demostrado que los monocitos $CCR2^+$ también juegan un papel importante. Por ejemplo en un modelo murino de daño en la piel por radiación UV, los monocitos $CCR2^+$ entran en la piel al cabo de 4 días, proliferan y se diferencian en células de Langerhans. La inflamación de la piel también promueve la migración de los monocitos $CCR2^+$ desde el torrente sanguíneo hacia los ganglios linfáticos que drenan la piel, vía las vénulas del endotelio alto (*high endothelial venules, HEV*). En este caso, el CCL2 (ligando de CCR2) forma un gradiente desde el foco inflamatorio al ganglio linfático, donde está unido a la superficie luminal de las HEV y media la entrada de células $CCR2^+$ (Palframan, RT et al. 2001).

2.7 Papel de los monocitos en la respuesta inmune adaptativa

Numerosos tipos celulares, incluyendo granulocitos, monocitos y macrófagos, están presentes en los lugares donde hay inflamación y activación de células T. Estas células pueden participar en la activación, polarización, y expansión de linfocitos. También pueden participar en la polarización de las células T mediante la captura y el transporte del antígeno, produciendo citoquinas y otros mediadores y a través de señales célula-célula. De todas las células que pueden estar implicadas en este proceso, los monocitos son excelentes candidatos para llevar a cabo estas tareas por numerosas razones (Geissmann, F et al. 2008).

- Los monocitos son rápidamente reclutados en los lugares de infección, concretamente los monocitos CCR2⁺ pueden ser extravasados al lugar de infección o inflamación en cuestión de minutos, como hemos mencionado anteriormente.
- Los monocitos dan lugar a macrófagos y a células dendríticas “inflamatorias”(Varol, C et al. 2009). Los monocitos pueden capturar antígenos en los tejidos periféricos y transportarlos a los ganglios linfáticos, producir citoquinas inflamatorias o anti-inflamatorias y diferenciarse en células presentadoras de antígeno (Geissmann, F et al. 2003; Sunderkotter, C et al. 2004).
- Los monocitos también pueden ser reclutados directamente desde la sangre a las áreas T de los ganglios linfáticos, a través de las HEV (Palframan, RT et al. 2001).

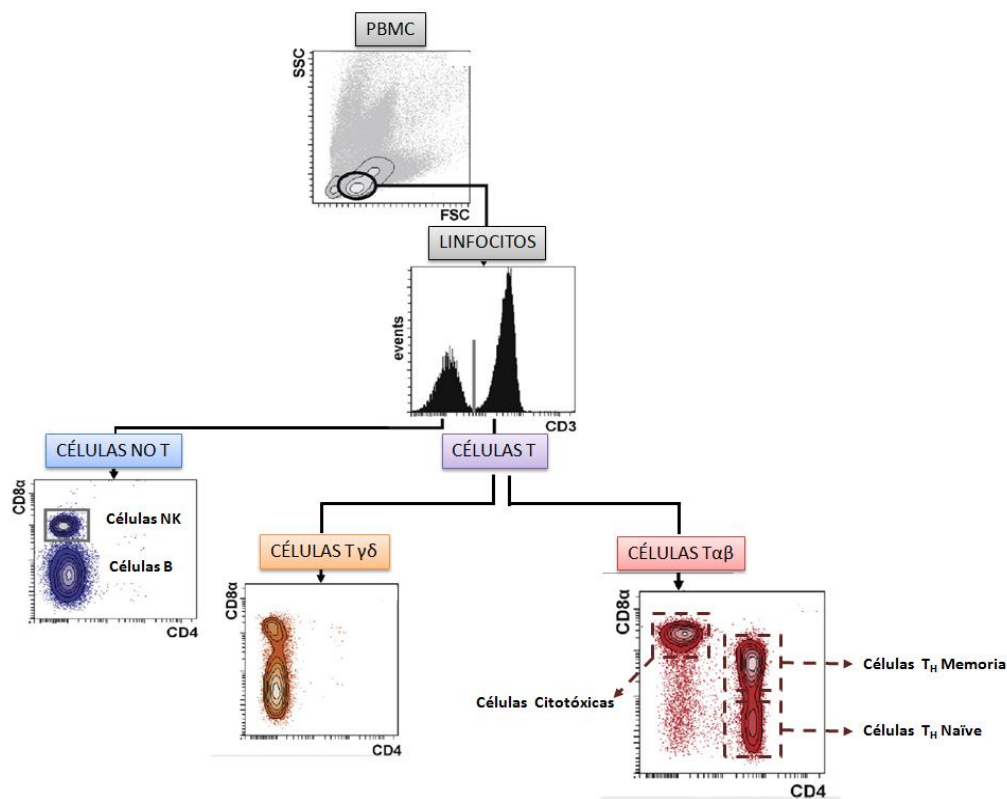
Estas dos últimas características posicionan a los monocitos en el momento y lugar exactos para la activación de las células T. Así, los monocitos juegan un papel importante en el transporte del antígeno, como fuente de DCs y además en el inicio de la respuesta, tanto primaria como secundaria, de las células T en los ganglios linfáticos (Geissmann, F et al. 2008).

3. LINFOCITOS T PORCINOS

Durante la última década la importancia del cerdo en la investigación agrícola y biomédica ha producido un incremento sustancial de los esfuerzos para investigar el sistema inmune porcino. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente a moléculas expresadas en linfocitos T, que constituyen una

herramienta para su identificación. En el cerdo se han hecho muchos esfuerzos para identificar las subpoblaciones de linfocitos T con éxito limitado.

Los linfocitos T $\alpha\beta$ porcinos se han descrito como $CD3^+CD2^+CD5^{alt}CD6^+$ (Gerner, W et al. 2009; Yang, H et al. 1996). En función de CD4 y CD8 se pueden identificar cuatro subpoblaciones: $CD4^+CD8\alpha^+$, $CD4^+CD8\alpha^-$, $CD4^-CD8\alpha^+$, y una fracción muy pequeña de $CD4^-CD8\alpha^-$. Estas cuatro subpoblaciones pueden a su vez ser subdivididas basándose en la expresión de CD8 β , las moléculas del MHC de clase II y las isoformas de alto peso molecular de CD45 (CD45RA o CD45RO), cuya expresión se asocia con células *naïve* (Figura 7).



Adaptado de Gerner W, 2009

Figura 7. Esquema del fenotipo de los linfocitos sanguíneos porcinos.

La existencia de una población considerable de células T $CD4^+CD8^+$ es una peculiaridad del sistema inmune porcino, descrita a finales de los años 80. El tamaño de esta población es variable, pudiendo comprender desde el 5% en lechones, hasta el 80% en cerdos adultos. Esta población está predominantemente compuesta por células $CD4^+$ que después de la activación expresan la cadena CD8 α , manteniendo luego este fenotipo. Se les ha atribuido ser células de

memoria, lo que se basa en su capacidad de responder a la segunda aparición de un antígeno, aumento de la proporción con la edad, producción de IFN- γ y su localización en lugares de inflamación (Gerner, W et al. 2009). Algunas de estas características también son propias de las células CD4⁺CD8⁺ humanas y de mono (Zuckermann, FA 1999).

Parece que los cambios en la composición de las subpoblaciones CD4/CD8 en la sangre están asociados con una maduración extratímica de los linfocitos T porcinos y la diferenciación de las células T cooperadoras (Saalmuller, A et al. 2002).

El marcador 2E3 se describió por nuestro grupo y marca una subpoblación de células CD3⁺CD4⁺, pero no células mieloides, ni células B o NK. Este antígeno se expresa parcialmente en células CD4⁺CD8 α ⁺, aunque la mayoría de las células que marca son CD4⁺CD8 α ⁻. Las células CD4⁺2E3⁺ son en su mayoría CD45RA⁺ fenotipo asociado a células *naïve* (Revilla, C et al. 2005a; Revilla, C et al. 2004). Estudios in vitro también mostraron que la expresión de 2E3 está restringida a células T *naïve*, dado que la proliferación antígeno-específica se limita a las células CD4⁺2E3⁻ (Revilla, C et al. 2004).

Como en otros ungulados, los linfocitos porcinos T $\gamma\delta$ son mayoritarios en las PBMC de animales jóvenes, disminuyendo posteriormente con la edad (Yang, H et al. 1996). Las células T $\gamma\delta$ porcinas exhiben una expresión débil de CD5 y CD6, al contrario que las T $\alpha\beta$ (Saalmuller, A et al. 1994). Por otro lado, todas las células T $\gamma\delta$ sanguíneas son CD8 β negativas. A pesar de haber sido objeto de numerosos estudios, el conocimiento de la función de las células T $\gamma\delta$ porcinas es aún rudimentario. Algunos estudios apuntan al potencial de esta población para formar células de memoria (Lee, J et al. 2004). Otros autores han descrito su capacidad citolítica (Yang, H et al. 1997), aunque otros muestran que no expresan perforina (Takamatsu, HH et al. 2006).

4. QUIMIOQUINAS

La capacidad del sistema inmune para responder a la presencia de un patógeno, al daño tisular o a otro problema fisiológico, depende en gran medida de la capacidad para reclutar leucocitos específicos en lugares concretos y para activar a

estos leucocitos en el momento adecuado. La migración dirigida de las células es también necesaria para el desarrollo de los distintos tipos de leucocitos (Rossi, D et al. 2000). Todos estos fenómenos se organizan por medio de las quimioquinas y sus receptores.

Las quimioquinas son proteínas básicas, que tienen entre 70 y 125 aminoácidos (Figura 8), con pesos moleculares que varían entre los 6 y los 14 kDa. Las quimioquinas actúan a través de receptores que constan de siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G (Murphy, PM 1994). Hasta la fecha se han descrito más de 50 quimioquinas y 20 receptores para ellas (Tabla 1) (Ransohoff, RM 2009). Tradicionalmente las quimioquinas y sus receptores se han dividido en cuatro familias (CXC, CC, C, y CX₃C), basándose en su patrón de residuos cisteína (la C representa cisteína y la X representa otros aminoácidos que se encuentran entre las dos primeras cisteínas) (Le, Y et al. 2004). En el año 2000 se introdujo un sistema de nomenclatura por el cual cada ligando y su receptor es clasificado en una subfamilia y se le da un número de identificación (Bacon, K et al. 2002).

Otra clasificación ampliamente utilizada está basada en criterios funcionales que dividen a las quimioquinas en “inflamatorias” y “homeostáticas” (Le, Y et al. 2004). Las quimioquinas homeostáticas se expresan de forma constitutiva y coordinan la migración basal de las células del sistema inmune, necesaria para su buen funcionamiento. También participan en algunos procesos de desarrollo que requieren movimientos complejos de las células. En este sentido, el desarrollo de las células T y B implica la migración a través de áreas especializadas dentro de los órganos linfoides secundarios, que es parcialmente controlada por quimioquinas (Ansel, KM et al. 2000). La función de vigilancia que desempeña el sistema inmune en los lugares de riesgo de entrada de patógenos, como la piel, las mucosas o los pulmones, también requiere la expresión de quimioquinas en estas zonas (Rossi, D et al. 2000). Algunos ejemplos de quimioquinas homeostáticas que veremos más en profundidad son CCL19, CCL21 y CXCL12.

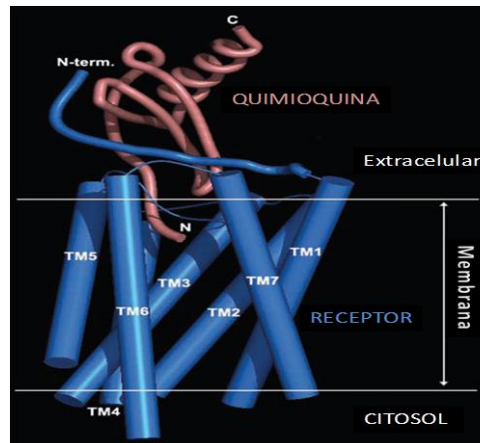


Figura 8. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la unión de las quimioquinas a sus receptores

Muchas quimioquinas muestran un patrón de expresión que sugiere un papel en la inflamación. Estas quimioquinas se inducen en monocitos y macrófagos o en células epiteliales, endoteliales o fibroblásticas, en respuesta a citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α) o a estímulos inflamatorios (LPS). Las quimioquinas pueden tener una función pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, dependiendo del tipo de citoquinas que participan en su producción y del tipo de células que se ven implicadas (Rossi, D et al. 2000). Las quimioquinas inflamatorias son expresadas por leucocitos circulantes y otras células tras su activación (Allen, SJ et al. 2007). Un ejemplo característico de quimioquina inflamatoria es CCL2.

Algunas quimioquinas no pueden ser clasificadas en ninguna de estas dos categorías o pueden ejercer ambas funciones, dependiendo del contexto biológico o el estado patológico. Un ejemplo de esta categoría es CX₃CL1 que se expresa en el cerebro y tiene una función homeostática, aunque se induce en respuesta a TNF- α en células endoteliales y puede participar en reacciones inflamatorias (Rossi, D et al. 2000).

Familia	Nombre sistemático	Nombre alternativo	Receptor
Quimioquinas C (familia γ)	XCL1	Linfotactina, ATAC, SMC-1 α	XCR1
	XCL2	SCM-1 β	XCR1
Quimioquinas CC (Familia β)	CCL1	I-309	CCR8
	CCL2	MCP-1, MCAF, TDCF	CCR2
	CCL3	MIP1-1 α , LD8 α	CCR1, CCR5
	CCL3L1	LD78 β	--
	CCL3L3	LD78 β	--
	CCL4	MIP-1 β	CCR5
	CCL4L1	AT744.2	--
	CCL4L2	--	--
	CCL5	Rantes	CCR1, CCR3, CCR5
	CCL6	--	--
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
	CCL9/CCL10	--	CCR1
	CCL11	Eotaxin	CCR3
	CCL12	MCP-5	--
	CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL14	HCC-1, HCC-3, NCC-2, CK β 1, MCIF	CCR1
	CCL15	HCC-2, NCC-3, MIP-5	CCR1, CCR3
	CCL16	NCC-4, LEC, LMC, LCC-1	CCR1, CCR2, CCR5
	CCL17	TARC	CCR4
	CCL18	PARC, MIP-4, DC-CK1	--
	CCL19	ELC, MIP-3 β , exodus-3, CK β 11	CCR7
	CCL20	MIP-3, LARC, exodus-1	CCR6
	CCL21	SLC, 6CKine, exodus-2, TCA4	CCR7
	CCL22	MDC, STCP-1, DC/B-CK	CCR4
	CCL23	MIP-3, MPIF-1, CK β 8	CCR1
	CCL24	MPIF-2, CK β 6, eotaxin-2	CCR3
	CCL25	TECK, CK15	CCR9
	CCL26	eotaxin-3, IMAC, MIP-4 α , TSC1	CCR3
	CCL27	ALP, ILC, ESKine, PESKY	CCR10
	CCL28	MEC	CCR3, CCR10
Quimioquinas CXC (Familia α)	CXCL1	GRO α , MGSA α	CXCR1, CXCR2
	CXCL2	GRO β , MGSA β	CXCR2
	CXCL3	GRO γ , MGSA γ	CXCR2
	CXCL4	PF-4	CXCR3B
	CXCL5	ENA-78	CXCR2
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
	CXCL7	NAP-2	--
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
	CXCL9	MEG	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL10	IP-10	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL11	J-TAC	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4, CXCR7
	CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR5
	CXCL14	BRACK, BODEKINE	--
	CXCL15	--	--
	CXCL16	--	CXCR6
	CXCL17	DMC	--
Quimioquinas C	XCL1	LINFOTACTINA, ATAC,	XCR1
	XCL2	SCM-1	XCR1
Quimioquinas CX ₃	CX ₃ CL1	FRACTALKINA	CX ₃ CR1

Tabla 1. Quimioquinas y sus receptores.

4.1 Papel no quimiotáctico de las quimioquinas

Las quimioquinas no solo son responsables de la migración celular, sino también de la activación de ciertos tipos celulares. Por ejemplo, ciertas quimioquinas pueden actuar sobre la diferenciación de las células T. Algunos receptores de quimioquinas se utilizan para definir distintos tipos de células T: CCR5 y CXCR3 son característicos de células Th1, mientras que CCR4 lo es de Th2 (Wong, MM et al. 2003). Se ha propuesto también que la inducción de una respuesta Th1 puede ser el resultado de la interacción del receptor de quimioquinas CCR5 con sus ligandos (CCL3, CCL4 y CCL5), sin necesidad de otro estímulo, indicando que las quimioquinas pueden actuar sobre la diferenciación de las células T (Zou, W et al. 2000).

Hay evidencias que apuntan a un papel de las quimioquinas en la finalización de la respuesta inmune, como la quimioquina CXCL12 que puede inducir la apoptosis de células T (Colamussi, ML et al. 2001).

4.2 Receptores de quimioquinas y mecanismos moleculares de transducción de señales.

Los receptores de quimioquinas constan de siete segmentos transmembrana acoplados a la proteína G (GPCRs). Su activación induce el intercambio de GTP por GDP por parte de la subunidad $G\alpha$ y la disociación de esta subunidad del complejo heterotrimérico del receptor, resultando por un lado $G\alpha$ y por otro $G\beta\gamma$. La señalización a través de GPCRs es un proceso complejo en el que se produce una cadena o cascada de fosforilaciones de tirosinas (Wong, MM et al. 2003).

Muchas quimioquinas ejercen su efecto mediante la activación por una ruta común de transducción de señales, la ruta Jak-Stat. La unión del ligando a su receptor específico provoca la agregación del receptor, conduciendo a la activación catalítica de la tirosin-quinasa citoplásmica, llamada Jak (Janus quinasa) y a la fosforilación y activación de transductores de señales monoméricos y activadores de la transcripción (Stat). Las proteínas Stat fosforiladas se dimerizan y se trasladan al núcleo, donde se unen específicamente a secuencias promotoras, regulando así la expresión de los genes afectados (Mellado, M et al. 2001). Hay numerosas evidencias de que la activación de muchos receptores de quimioquinas transducen

la señalización a través de activadores Jak-Stat, quizás mediante un mecanismo que requiere la dimerización del receptor (Mellado, M et al. 2001; Vila-Coro, AJ et al. 1999).

La activación de los receptores de quimioquinas puede disparar numerosas cascadas de señalización. Además, la oligomerización de los receptores incrementa esta complejidad, formando una red compleja de cascadas de señalización (Mellado, M et al. 2001).

El proceso adquiere aún otro nivel de complejidad cuando se producen interacciones entre los receptores de quimioquinas y otros tipos de receptores de la superficie celular, en un proceso conocido como transactivación. Por ejemplo, CCR5 induce un perfil de fosforilación de proteínas similar al observado después de la activación directa del TCR, indicando que CCL5 puede activar de alguna manera al TCR (Bacon, KB et al. 1995).

4.3 Quimioquinas utilizadas en esta tesis.

Vamos a hacer énfasis en ciertas quimioquinas que por sus características nos interesan especialmente, sobre todo por su actividad quimiotáctica en subpoblaciones celulares, tanto en linfocitos, como en monocitos.

4.3.1 CXCL12 y sus receptores CXCR4 y CXCR7

La quimioquina CXCL12, también conocida como SDF-1, fue identificada originalmente como un factor de crecimiento de precursores de células B. Actúa principalmente a través del receptor CXCR4, pero también a través de CXCR7 (Burns, JM et al. 2006). Inicialmente se identificaron dos formas de procesamiento alternativo, SDF-1 α y SDF-1 β . SDF-1 α es una proteína de 89 aminoácidos y es la forma predominante, mientras que SDF-1 β contiene una extensión de cuatro aminoácidos - R F K M - en el extremo carboxilo. SDF-1 α y SDF-1 β se unen a su receptor CXCR4 con una afinidad similar (Hesselgesser, J et al. 1998). Posteriormente se han identificado cuatro variantes más que contienen una extensión de 30 (SDF-1 γ), 31 (SDF-1 δ), 1 (SDF-1 ξ) y 51 (SDF-1 ϕ) aminoácidos en el extremo carboxi-terminal. Estas isoformas son funcionales y tienen diferente

distribución en los tejidos; sin embargo su significado biológico todavía es desconocido (Busillo, JM et al. 2007).

Se cree que CXCL12 dirige la migración de las células T a lugares específicos. Además de su acción quimiotáctica y coestimuladora para células T, CXCL12 se expresa de forma constitutiva en varias células y es quimiotáctica también para monocitos, neutrófilos y precursores de células B (Nanki, T et al. 2000).

CXCL12 se clasifica como una quimioquina homeostática que participa en la regulación de la homeostasis de muchos tejidos, en la regulación del sistema inmune y en la respuesta inflamatoria (Luther, SA et al. 2002). Durante el desarrollo embrionario, CXCL12 dirige la proliferación y diferenciación de las células progenitoras inmaduras, mediante la activación de la maquinaria de adhesión, reorganización del citoesqueleto, control del ciclo celular y secreción de enzimas proteolíticas (Karin, N 2010). Además CXCL12 se expresa constitutivamente en células de la médula ósea y otros tejidos que incluyen la piel, el corazón, las células epiteliales de los conductos biliares y el endotelio cerebral. Esta expresión constitutiva participa en el tráfico y localización de los leucocitos en estos tejidos (Peled, A et al. 1999). CXCL12 está también implicada en la homeostasis de los neutrófilos, tanto en situaciones basales como de estrés, de manera que dirige su migración hacia distintos órganos (Eash, KJ et al. 2009). Además dirige el tráfico de otros leucocitos, particularmente monocitos y linfocitos T, hacia órganos linfoides (Bleul, CC et al. 1996).

Además de a sus receptores se sabe que CXCL12 (al igual que otras quimioquinas) se puede unir también a glucosaminoglicanos, como el heparán sulfato, formando así gradientes de concentración de quimioquinas inmovilizadas (Hoogewerf, AJ et al. 1997). Con altas concentraciones de quimioquina, la unión a heparán sulfato induce la oligomerización de CXCL12, lo que a su vez induce la oligomerización de CXCR4, potenciando así su acción (Sadir, R et al. 2001).

Por todo esto CXCL12 está siendo considerada como diana de varias terapias en enfermedades del sistema inmune, en cáncer y en SIDA, aunque la dificultad de controlar los efectos de la supresión o del aumento de expresión en todo el organismo hace que estas terapias sean controvertidas (Karin, N 2010).

4.3.2 CCL19, CCL21 y su receptor común CCR7

CCL19 es también conocido como “*EB11 ligand chemokine*” (ELC) y “*macrophage inflammatory protein-3-beta (MIP-3 β)*”. Se expresa abundantemente en timo y órganos linfoides, en niveles moderados en la tráquea y colon, y en niveles bajos en estómago, intestino delgado, pulmón, riñón y bazo (Yoshida, R et al. 1998b). El gen que codifica el CCL19 porcino está localizado en el cromosoma 10 y da lugar a una proteína de 100 aminoácidos y 13 kDa (Ledger, TN et al. 2004).

CCL21 es también conocido como “*secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC)*”. El gen que codifica el CCL21 porcino se encuentra también en el cromosoma 10. Da lugar a una proteína de 134 aminoácidos y 15,5 kDa (Ezquerro A, 2003). CCL21 posee una cola en el extremo C-terminal de 32 aminoácidos - 12 de los cuales son aminoácidos básicos - que permite una unión ávida de la quimioquina con glicosaminoglicanos y otras moléculas de la superficie celular (Yoshida, R et al. 1998b). Esta unión puede tener un papel en la presentación eficiente de CCL21 en la superficie de las células endoteliales y otras células (Yoshida, R et al. 1998b).

Las quimioquinas CCL19 y CCL21 se expresan de forma constitutiva y controlan el movimiento celular afectado durante la homeostasis (Stein, JV et al. 2000). Son los dos únicos ligandos del receptor CCR7. CCR7 y sus dos ligandos están implicados en homeostasis, así como en el tráfico de un amplio espectro de células sanguíneas hacia los ganglios linfáticos. En humanos, CCL19 induce migración de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, de forma especialmente eficiente después de su activación. Dentro de las células T, CCL19 también atrae tanto células CD45RO⁺ (consideradas células de memoria), como células CD45RO⁻ (consideradas células *naïve*) (Yoshida, R et al. 1998a).

CCR7 se expresa en DCs semimaduras y maduras, en timocitos durante algunas etapas de su desarrollo, en células B y en células T *naïve*, en células T reguladoras y en células T de memoria central. También se ha descrito expresión en monocitos, concretamente en estudios en ratón se ha encontrado expresión de CCR7 en la población Ly-6C⁺ o población de monocitos *intermedia* (Forster, R et al. 2008; Qu, C et al. 2004). En el cerdo los transcritos de CCR7 se expresa en una población de células T *naïve* CD4⁺2E3⁺ y en DC derivadas de monocitos (Facci, MR et al. 2010; Revilla, C et al. 2005a).

CCL19 se une a CCR7 con una afinidad ligeramente mayor que CCL21 y, aunque ambos ligandos inducen movilización de calcio, quimiotaxis y adhesión mediada por integrinas, CCL19 parece ser más potente a bajas concentraciones. CCL19, pero no CCL21, estimula la fosforilación e internalización del receptor, produciendo la desensibilización del mismo. No está claro aún cómo esta diferencia en señalización se regula en los microambientes que contienen las dos quimioquinas (Kohout, TA et al. 2004) .

La señalización a través de CCR7 controla principalmente la migración de las células del sistema inmune, DCs y subpoblaciones de células T, a los órganos linfoides secundarios (ganglios, bazo o placas de Peyer) y subsecuentemente su posición en compartimentos funcionales definidos (Sanchez-Sanchez, N et al. 2006).

CCR7 participa en la generación de la respuesta inmune, así como en su silenciamiento y regulación. La mayor parte del conocimiento del papel del CCR7 en el desarrollo de la respuesta inmune y en la tolerancia, deriva de modelos de ratón. Los datos en otras especies, incluyendo el humano, son escasos. Sin embargo los patrones de expresión de CCR7 en humano y ratón son similares.

4.3.3 CCL2 y SU RECEPTOR CCR2

La quimioquina CCL2, también conocida como “ monocyte chemoattractant protein-1” (MCP-1), se caracterizó en humanos por su fuerte capacidad quimiotáctica sobre los monocitos (Van Coillie, E et al. 1999). El gen que codifica el CCL2 porcino está localizado en el cromosoma 12 y da lugar a una proteína de 144 aminoácidos y 16 kDa de peso molecular (Hosang, K et al. 1994).

CCL2 es producida por una gran variedad de tipos celulares que incluye fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, músculo liso, astrocitos, células mesangiales y microglía. Sin embargo, los monocitos y macrófagos son su mayor fuente (Deshmane, SL et al. 2009). CCL2 regula la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T de memoria y células NK (Yoshimura, T et al. 1989).

CCL2 ejerce su efecto a través del receptor CCR2. Aunque CCL2 se une a CCR2 con gran afinidad, CCR2 es un receptor promiscuo que puede unir también CCL7 (MCP-3), CCL12 (MCP-5) y CCL13 (MCP-4) (Le, Y et al. 2004). En humanos existen dos formas de procesamiento alternativo de CCR2 denominadas CCR2A y CCR2B.

La forma CCR2A se expresa en células mononucleares y en células de músculo liso de los vasos, mientras que monocitos y células NK activadas expresan CCR2B. Es posible que estas dos isoformas induzcan rutas de señalización diferentes (Bartoli, C et al. 2001). CCR2 participa tanto en procesos pro-inflamatorios como anti-inflamatorios. El papel inflamatorio es dependiente de APCs y de células T, mientras que el papel anti-inflamatorio es dependiente de su expresión en células T reguladoras (Deshmane, SL et al. 2009).

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que CCL2 es capaz de reclutar a los monocitos “clásicos” en los lugares de inflamación, sin embargo no está claro si los monocitos utilizan las mismas señales celulares para migrar de la sangre a los tejidos en condiciones homeostáticas (Ajuebor, MN et al. 1998). CCR2 también participa en la adhesión de los monocitos al endotelio vascular de forma independiente de la cascada típica de integrinas que hemos comentado en el apartado 2.2, dado que la estimulación de los monocitos con CCL2 aumenta su adhesión al CX₃CL1, inmovilizado en el endotelio (Green, SR et al. 2006). También se ha demostrado el efecto quimiotáctico de CCL2 sobre las DCs y sus precursores, sobre todo en las primeras fases del reclutamiento (Vanbervliet, B et al. 2002). Aparte de reclutar monocitos y dirigir el movimiento de leucocitos, CCL2 actúa sobre la función de las células T. En este sentido CCL2 se ha asociado con la polarización hacia respuestas Th1 (Frauenschuh, A et al. 2004).

CCL2 es una de las quimioquinas más estudiadas por su papel fundamental en la infiltración mononuclear en muchas enfermedades inflamatorias (Lu, B et al. 1998).

5. EL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (SRRP).

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) se describió por primera vez en 1987 en EEUU (Goyal, SM 1993) y en 1990 en Europa (Wensvoort, G et al. 1991). Aunque los signos clínicos asociados al SRRP son similares en Europa y en América, los virus de los dos continentes presentan genotipos distintos y diferencias considerables (Pirzadeh, B et al. 1997). El SRRP continúa siendo una

amenaza seria que causa un impacto importante en la industria porcina mundial (Neumann, EJ et al. 2005).

5.1 Clasificación taxonómica

El virus del SRRP, también conocido como Arterivirus porcino, está incluido en el género Arterivirus, de la familia Arteriviridae. La familia Arteriviridae, pertenece al orden de los Nidovirales (Cavanagh, D 1997). Los cuatro miembros del género Arterivirus (virus de la elevación de la lactato deshidrogenasa del ratón -LDV-, virus de la arteritis equina -EAV-, virus de la fiebre hemorrágica del simio -SHFV- y SRRP) comparten propiedades biológicas y moleculares: organización del genoma, gran variabilidad genética, estrategia de replicación, secuencia de transcripción, composición proteica, morfología del virión, especificidad celular muy restringida (replicación primaria en macrófagos) y capacidad de provocar desde infecciones asintomáticas hasta casos clínicos graves e incluso fatales (Snijder, EJ et al. 1998).

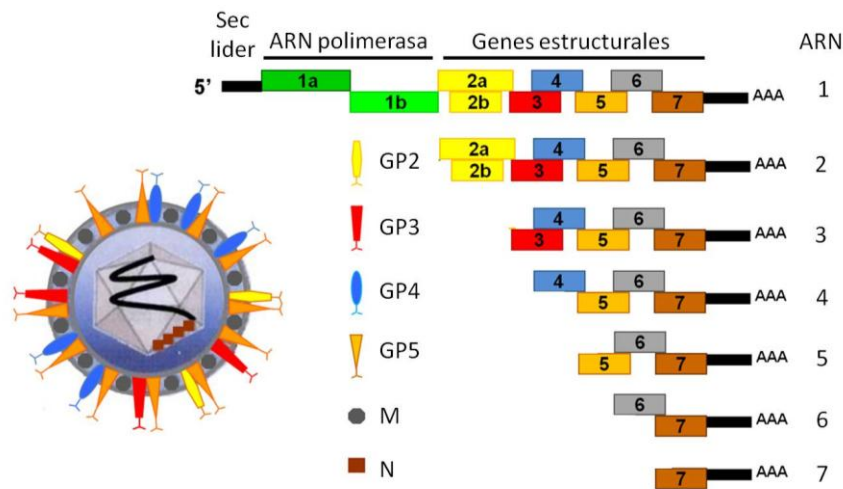
5.2 Organización genómica y proteica del virus de SRRP.

El virión completo es de tamaño pequeño, esférico y con envoltura. Oscila entre 48 y 83 nm, mientras que la nucleocápside, de simetría icosaédrica oscila entre los 25 y 30 nm (Mardassi, H et al. 1994). El genoma está formado por una única cadena de RNA de polaridad positiva de 15.100 bases, no segmentada y poliadenilada. Esta cadena está compuesta por nueve marcos de lectura abierta (ORFs) que se solapan parcialmente entre sí (Conzelmann, KK et al. 1993). Las ORF 1a y 1b ocupan 12.000 bases, aproximadamente el 80% del genoma, y codifican proteínas no estructurales que participan en la transcripción y la replicación del RNA, incluyendo la RNA-polimerasa. El resto del genoma lo componen las ORFs que codifican las proteínas estructurales que forman el virión (ORF 2-7) (Snijder, EJ et al. 1998).

El virión está constituido por tres proteínas principales: la glicoproteína 5 (GP5) (codificada por la ORF5), las proteínas M y N (codificadas por la ORF6 y ORF7, respectivamente), que forman parte de la nucleocapside; tres glicoproteínas menores (GP2a, GP3, GP4, codificadas por las ORF 2a, 3 y 4, respectivamente) y por

una pequeña proteína no glicosilada denominada 2b (Figura 9) (Mardassi, H et al. 1994).

En el virión, la GP5 y la proteína M forman un heterodímero con puentes disulfuro que está involucrado en la unión al receptor celular (Van Breedam, W et al. 2010). La proteína N es la más inmunogénica, y la GP5 se ha descrito como la principal portadora de epítomos neutralizantes (Pirzadeh y Dea 1997), aunque también se han detectado epítomos neutralizantes en GP4 (Costers, S et al. 2010), en la proteína M y en GP3 (Yang, L et al. 2000).



Adaptado de Snijder EJ y Meulenbergh JJM, 1998

Figura 9. Representación esquemática de la partícula del virus del SRRP y de la localización de las proteínas estructurales GP2-GP5, M y N (codificadas por las ORFs 2-7 respectivamente)

5.3 Tropismo viral y mediadores de la entrada del virus.

El virus del SRRP replica principalmente en células de la línea monocito/macrófago, especialmente en los macrófagos alveolares porcinos y en los macrófagos intravasculares de pulmón (Zimmerman, JJ et al. 2006). Para estudios *in vitro* de la infección celular se usan comúnmente cultivos primarios de macrófagos alveolares. La línea celular MA-104 (riñón de mono verde africano) y sus derivados (MARC-145) permiten el crecimiento del virus del SRRP y son utilizadas comúnmente para su estudio (Teifke, JP et al. 2001). El proceso de internalización del virus está mediado por sialoadhesina (Vanderheijden, N et al. 2003), estando también implicado el CD163 en el proceso (Calvert, JG et al. 2007; Welch, SK et al. 2010).

5.4 Respuesta inmune.

La cinética de la respuesta humoral se ha estudiado tanto en infecciones naturales como experimentales. Hacia el final de la primera semana post-infección (p.i.) se detectan ya anticuerpos específicos de la clase IgM, que son los primeros en aparecer. El título de estos anticuerpos alcanza su máximo entre los días 14 y 21, después de lo cual cae rápidamente hasta hacerse indetectable entre los días 35 y 42. Por otro lado, los anticuerpos específicos de isotipo IgG alcanzan sus niveles más altos entre los días 21 y 28 p.i. y se mantienen de 3 a 6 meses (Vezina, SA et al. 1996). La aparición de anticuerpos neutralizantes (AN) es tardía, alrededor del día 28 p.i. (Díaz, I et al. 2005). Sin embargo se ha descrito que el virus puede ser aislado del suero o de tejidos de cerdos que presentan AN, lo que parece indicar que los AN no son demasiado eficientes en el control de la infección (Vezina, SA et al. 1996).

En cuanto a la especificidad de los anticuerpos, los primeros en ser detectados, alrededor del día 7 p.i., van dirigidos frente a la proteína N (Nelson, EA et al. 1994). Esto, junto con el hecho de que los epítomos de la proteína N son los más conservados entre distintas cepas, convierte a esta proteína en la candidata ideal para la detección de anticuerpos específicos frente al virus en el diagnóstico de la enfermedad. Tras la primera semana p.i. también se detectan anticuerpos dirigidos frente a la GP5, mientras que los anticuerpos frente a la proteína M se empiezan a detectar al final de la segunda semana. (Yoon, KJ et al. 1995)

Además de anticuerpos, los cerdos infectados desarrollan una respuesta celular frente al virus del SRRP. Las células (PBMC) de cerdos que se recuperan de una infección experimental proliferan en respuesta al virus, detectándose esta respuesta a partir de las 4 semanas p.i., alcanzando el máximo a las 7 semanas, y disminuyendo hacia las 11 semanas. Se ha determinado que las proteínas M, N y GP5 están implicadas en la inducción de la respuesta celular (Bautista, EM et al. 1997; Bautista, EM et al. 1999; Lopez Fuertes, L et al. 1999).

5.5 Vacunación frente al virus de SRRP

Existen dos tipos de vacunas en el mercado frente al virus del SRRP, atenuadas e inactivadas. Aún así, la enfermedad está bastante extendida y el virus es

frecuentemente reintroducido en granjas después de su erradicación. Sin embargo, el uso de estas vacunas está muy extendido, a pesar de que su efectividad es baja (Van Breedam, W et al. 2010).

La complejidad de la respuesta inmune frente al virus del SRRP y la habilidad del virus para escapar o modular al sistema inmune del huésped, hace que sea complicado desarrollar una vacuna que pueda erradicar la enfermedad (Huang, YW et al. 2010). Esa vacuna debería poseer al menos cuatro características: eficacia, universalidad, seguridad y la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados (Mateu, E et al. 2008). Uno de los principales problemas al que se debe hacer frente para obtener una vacuna frente al SRRP es la elevada variabilidad genética del virus, que compromete la protección frente a cepas heterólogas (Meng, XJ 2000). Las vacunas confieren protección frente a cepas homólogas, pero no frente a cepas heterólogas (Labarque, G et al. 2004). Hay otros dos problemas de difícil solución que debe afrontar esta vacuna. Primero, la dificultad en el laboratorio de obtener una carga de antígeno suficiente. Obviamente este inconveniente es mayor en el caso de las vacunas inactivadas. El segundo inconveniente es que las células diana del virus del SRRP son las células del linaje monocito/macrófago, que son protagonistas de la coordinación de la respuesta inmune. En este caso, el inconveniente es mayor para las cepas atenuadas, ya que aún conservan su capacidad infectiva (Huang YW et al. 2010).

Las vacunas atenuadas son más eficaces que las inactivadas, induciendo mejores respuestas celulares y humorales (Pesch, S et al. 2005). Aún así, en el caso del SRRP, la respuesta inmune que inducen estas vacunas es insuficiente para proteger de la infección (Labarque, G et al. 2004). Las vacunas atenuadas inducen una producción baja de IFN- α y son capaces de inducir el desarrollo de células productoras de IFN- γ , aunque en menor medida que vacunas similares atenuadas de otros virus porcinos. Respecto a la respuesta humoral, las vacunas atenuadas del SRRP inducen una rápida producción de anticuerpos no neutralizantes, detectables en todos los animales a partir de las dos semanas tras la vacunación y descendiendo su producción a partir de las 32 semanas (Charerntantanakul, W et al. 2006). Por otro lado, la aparición de AN es muy irregular. El uso de adyuvantes convencionales con una vacuna atenuada no mejora la respuesta humoral

neutralizante, a diferencia de lo que ocurre con la vacuna atenuada de la enfermedad de Aujeszky. En resumen, las vacunas atenuadas frente al SRRP generan respuestas lentas y de baja intensidad (Meier, WA et al. 2003). Además, las vacunas atenuadas presentan otros inconvenientes: los virus atenuados pueden provocar estados virémicos y pueden excretarse y transmitirse a cerdos no infectados. Además, los virus atenuados pueden revertir y hacerse virulentos (Nielsen, HS et al. 2001).

Por lo que respecta a las vacunas inactivadas, éstas tienen la ventaja de no revertir a la virulencia, pero inducen una respuesta más pobre que las atenuadas (Plana-Duran, J et al. 1997). En cuanto a la respuesta celular, existe cierta controversia. Algunos autores no encuentran un aumento significativo de la frecuencia de células productoras de IFN- γ (Nilubol, D et al. 2004), mientras otros demuestran una producción significativa de IFN- γ y que la vacuna inactivada es capaz de primar a los linfocitos CD4⁺CD8⁺ y CD8^{alt} (Piras, F et al. 2005).

5.6 Nuevas estrategias de vacunación

Como hemos visto, las vacunas actuales frente al SRRP tienen una eficacia limitada y se requiere una mejora de la estrategia de vacunación. En este sentido se han desarrollado algunos sistemas experimentales de vacunación empleando subunidades del virus codificadas en DNA plasmídico, bacterias o algunos virus (Cruz, JL et al. 2010; Plana-Duran, J et al. 1997). En nuestro laboratorio hemos desarrollado una estrategia en el modelo porcino para dirigir el antígeno por medio de anticuerpos monoclonales a receptores de APCs, en este caso a la sialoadhesina (CD169), obteniendo una mejora significativa en la respuesta celular (Poderoso, T et al. 2011; Revilla, C et al. 2009).

Por otra parte se está trabajando en el desarrollo de vacunas basadas en la inhibición de las células T reguladoras o en la inducción de una fuerte respuesta de IFN-I (Huang, YW et al. 2010). Otro campo en el que se trabaja intensamente es el desarrollo de adyuvantes que potencien la respuesta, especialmente en el caso de las vacunas DNA (Meier, WA et al. 2004).

6. VACUNAS DNA Y QUIMIOQUINAS COMO ADYUVANTES

La inmunización con ácidos nucleicos es una estrategia de vacunación en la que se utilizan construcciones de RNA o DNA que codifican inmunógenos específicos. Las construcciones con DNA transfectan las células del huésped, que se convierten en una fuente *in vivo* del antígeno (Kutzler, MA et al. 2004). La vacunación con DNA induce el procesamiento y la presentación de antígeno por parte de las células del huésped, asociado con las moléculas del MHC de tipo I y II (Figura 10). Además, las vacunas de DNA presentan la ventaja de ser fáciles de producir y de mantener, estabilidad biológica, bajos costes de producción y la posibilidad de diferenciar entre individuos vacunados e infectados (Dhama, K et al. 2008).

Aunque las vacunas de DNA inducen respuesta inmune celular y humoral en ratones cuando se utilizan en dosis altas, su inmunogenicidad en modelos animales de mayor tamaño es limitada (Barouch, DH et al. 2004). En los últimos años se han realizado numerosos experimentos con vacunas de DNA frente a diferentes enfermedades animales, como Herpes bovino, influenza y bronquitis infecciosa de aves, enfermedad de Aujeszky y peste clásica en cerdo. Sin embargo, dada la baja eficacia obtenida con estas estrategias, se hace necesario desarrollar estrategias de vacunación que produzcan una mejor respuesta inmune (Dhama, K et al. 2008).

Un elemento importante para la efectividad de las vacunas, es la utilización de adyuvantes adecuados que faciliten la inducción y el aumento de la respuesta inmunológica. En la generación de vacunas DNA se ha considerado la utilización de nuevos adyuvantes para producir una respuesta inmune más eficaz, sobre todo en animales de gran tamaño. Al ser las APCs las células responsables de captar, procesar y presentar el Ag a los linfocitos, dando lugar a la iniciación de la respuesta inmune, una de las tendencias actuales es la utilización de adyuvantes que promuevan la infiltración de células dendríticas u otras APC en el lugar de inoculación del antígeno (Seubert, A et al. 2008). Se ha descrito que el número de APCs presentes en el lugar de inoculación, durante la expresión del antígeno cuando se utiliza una vacuna DNA puede ser un factor limitante para la eficacia de ésta (Kutzler, MA et al. 2004). De hecho, dos de los adyuvantes más frecuentemente utilizados en la actualidad, el hidróxido de aluminio y la emulsión aceite-agua MF59, actúan induciendo la secreción de las quimioquinas CCL2, CCL3, CCL4 y

CXCL8, implicadas en el reclutamiento de macrófagos, monocitos y células dendríticas en el lugar de inoculación (Seubert, A et al. 2008).

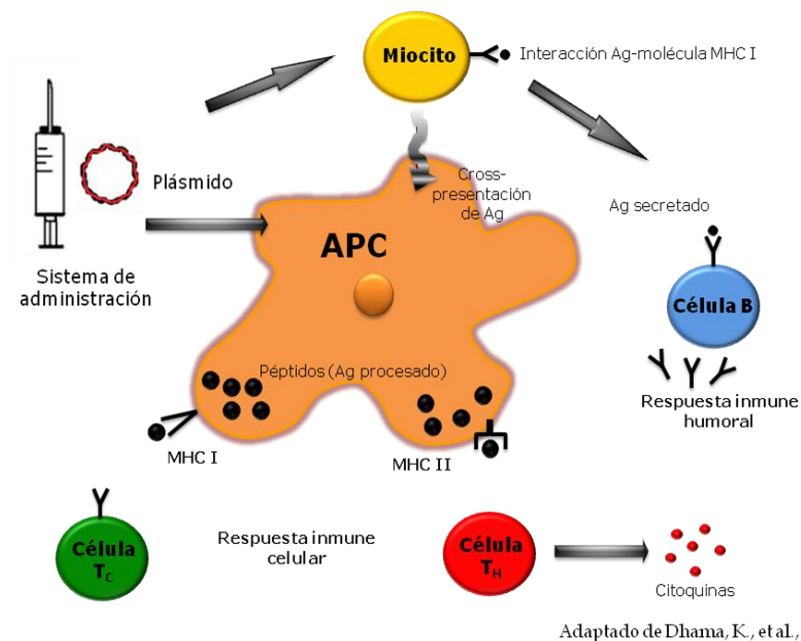


Figura 10. Esquema de la generación de las respuestas celular y humoral antígeno específicas producidas por las vacunas DNA.

Así, la coadministración de genes de citoquinas como adyuvantes moleculares de las construcciones vacunales de DNA puede mejorar la respuesta al antígeno (Kim, JJ et al. 2000). Como hemos visto, algunas quimioquinas son moléculas inflamatorias muy activas y sus receptores pueden jugar un papel importante en la respuesta inmune e inflamatoria, actuando como agentes quimiotácticos y como activadores de leucocitos. Las quimioquinas además juegan un papel en la diferenciación celular. Estas propiedades reguladoras hacen de las quimioquinas candidatos interesantes para la obtención de adyuvantes moleculares.

La administración de quimioquinas junto con antígenos se ha utilizado en diversos estudios con el fin de mejorar la respuesta inmune de las vacunas DNA (Barouch, DH et al. 2004). Por ejemplo la inyección intramuscular de MIP-1 α recluta células dendríticas en el lugar de inoculación y aumenta eficientemente la respuesta de células T CD8⁺ en un modelo de HIV en el ratón (Lu, Y et al. 1999). También en un modelo de ratón con desafío letal con el virus Herpes simple se ha comprobado un aumento de la inmunogenicidad y de la protección usando los ligandos de CCR5 como adyuvantes (Sin, J et al. 2000); y en otro modelo murino de

co-inmunización con antígenos del virus del SIDA en ratón, se ha observado que CCL3 y CCL5 aumentan la producción de anticuerpos específicos (Kim, JJ et al. 2000). En cerdo se ha demostrado que el CCL20 aumenta la respuesta humoral en un modelo de co-inmunización con el antígeno E2 del virus de la peste porcina clásica (Tarradas, J et al. 2011).

El reclutamiento y la activación de DCs en el sitio de inyección usando plásmidos con quimioquinas y quizá otras señales de maduración podrían ser efectivos, aumentando la respuesta a las vacunas DNA. Es posible que estas estrategias que mejoran la presentación de antígeno se puedan combinar con otras, destinadas a aumentar la proliferación y diferenciación de los linfocitos T.

OBJETIVOS

El sector porcino es el primer sector de la ganadería de nuestro país, con una producción anual que supone más de 4.000 millones de euros, lo que le establece como líder europeo. Además de su relevancia ganadera, el modelo porcino se ha desarrollado en las últimas décadas como posible fuente de xeno-transplantes y para el establecimiento de modelos de enfermedades humanas. Por consiguiente, el estudio del sistema inmune del cerdo ha generado un gran interés en los últimos años.

La migración controlada de los leucocitos y su posicionamiento en los lugares y momentos adecuados, tiene un papel esencial en la organización y función del sistema inmune. La mejora de las estrategias de vacunación en el cerdo requiere por lo tanto un mayor conocimiento de las quimioquinas y de sus receptores en las células inmunocompetentes, ya que son responsables de la organización de las migraciones mencionadas.

Para ello en esta Tesis hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Producción y evaluación de proteínas recombinantes de quimioquinas porcinas.
2. Estudio de la expresión de receptores de quimioquinas en subpoblaciones de monocitos.
3. Análisis de la expresión de CCR7 en subpoblaciones de linfocitos T
4. Estudio in vivo de la capacidad inmunoadyuvante de la quimioquina recombinante CCL2-GFP en un modelo de inmunización con DNA, utilizando como antígeno modelo la nucleoproteína del virus del SRRP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Se han empleado cerdos *Large-White* de edades comprendidas entre 2 y 12 meses como donantes de sangre y tejidos.

Para el experimento in vivo se utilizaron animales *Large white* de 10 semanas de edad.

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las normas del Comité de Ética del Instituto.

2. CÉLULAS Y LÍNEAS CELULARES

2.1 Células mononucleares sanguíneas (PBMC).

La obtención de la sangre se realizó mediante punción de la vena cava craneal, recogién dose en tubos estériles con EDTA (Merck, Alemania) como anticoagulante, a una concentración final de 8 mM. La sangre anticoagulada se sedimentó durante 30 minutos añadiendo una solución de dextrano (Dextran T500, Sigma. EE.UU), preparada al 6% en tampón fosfato salino (PBS) (BioWhittaker, Bélgica), pH 7.4, como describieron González et al (1990). Se recogió la fase superior rica en leucocitos y se centrifugó durante 15 minutos a 250 x g a temperatura ambiente (TA).

El sedimento celular se depositó sobre un gradiente de Percoll al 61% (GE, HealthCare Bio-science AB, Uppsala, Suecia) (González, S et al. 1990), y se centrifugó a 300 x g durante 15 minutos a TA. Las PBMC, localizadas en la banda de la interfase, se recogieron y se lavaron 2 veces en PBS con 2% suero fetal bovino (SFB) descomplementado (BioWhittaker, Bélgica). A continuación se resuspendieron en RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica) con 10% SFB, L-glutamina 2mM (BioWhittaker, Bélgica), β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Serva, Alemania) y 50 μ g/ml de gentamicina (BioWhittaker, Bélgica) (RPMI completo). En aquellas muestras en las que se observó contaminación de eritrocitos se llevó a cabo un tratamiento hipotónico para eliminarlos, para ello las células se resuspendieron en 9 ml de agua destilada durante 28 segundos, tras los cuales se añadieron 3 ml de NaCl al 3,5%.

El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer, utilizando azul Tripán al 0,1% (Dr. G. Gröbler & Co. Leipzig, Alemania) en PBS, como colorante vital.

2.2 Líneas celulares

Se utilizaron células de la línea CHO (Chinese hamster ovary) para las transfecciones, cultivadas con DMEM (BioWhittaker, Bélgica) suplementado con 2mM de L-glutamina, 5% de SFB descomplementado y 50 µg/ml de gentamicina (DMEM Completo).

Se utilizaron células de la línea MARC-145 para el cultivo del virus del SRRP, crecidas en medio DMEM completo.

3. ANTICUERPOS

A continuación se muestran los anticuerpos utilizados durante esta tesis, tanto los producidos en nuestro laboratorio (tabla 2), como los adquiridos comercialmente (tabla 3).

Reactividad	Anticuerpo	Isotipo	Patrón de expresión	Proveedor o referencia
CD11R1	MIL4	IgG ₁	Polimorfonucleares, NK y DCs	Haversonk et al, 1994
CD163	2A10/11	IgG ₁	Monocito/ macrófago	Bullido et al, 1997b Sanchez et al, 1999
CD169/ Sialoadhesina	1F1	IgG _{2a}	Monocito/DC	Revilla et al, 2009
CD25	6E2/12	IgG ₁	Células T activadas, células B activadas, precursores mieloides.	Bullido et al, 1997b
CD3	BB23-8E6	IgG _{2b}	Células T	Pescovitz, 1984
CD172a/SWC3	BL1H7	IgG ₁	Células mielomonocíticas	Alvarez, 2000
	BA1C11	IgG ₁		Alvarez, 2000
CD4	74-12-4	IgG _{2b}	Células Th	Pescovitz et al, 1984;1994
CD45RA	3C3/9	IgG ₁	Células linfoides	Bullido, 1997c
CD8α	76-2-11	IgG _{2a}	Subpoblación células T	Pescovitz, 1984
Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)	4B9	IgG ₁	Irrelevante	Domínguez, 1991
SLAI-DR	1F12	IgG _{2b}	Monocitos, macrófagos, Células B, células T naïve, células T memoria	Bullido, 1997
Vp30 (PPA)	1D9	IgG _{2a}	Irrelevante	(no publicado)

Tabla 2. Anticuerpos producidos en el laboratorio utilizados en esta tesis.

Nombre o abreviatura	Reactividad	Origen	Monoclonal / policlonal	Isotipo	Casa comercial
1AC7	Nucleoproteína de VSRRP (cepa europea)	Ratón	Monoclonal	IgG _{2a}	Ingenasa (España)
1CH5		Ratón	Monoclonal	IgG _{2b}	
A81-5-FITC	IgG1 murino	Rata	Monoclonal	IgG1	BD Pharmingen (EE.UU)
Anti-GFP-A488	GFP	Conejo	Policlonal		Molecular Probes (Reino Unido)
Anti-GFP-biotina	GFP	Cabra	Policlonal		Rockland (EE.UU)
Anti-GFP-HRP	GFP	Ratón	Monoclonal	IgG ₁	Miltenyi Biotec (Alemania)
Anti-human IgG Fc	Fc de IgG humana	Cabra	Policlonal		Rockland (EE.UU)
Anti-human IgG Fc - Biotina	Fc de IgG humana	Cabra	Policlonal		Ebioscience (EE.UU)
Anti-human IgG-FITC	IgG humana	Cabra	Policlonal		Bio-rad (EE.UU)
B-Ly4	CD21 humano	Ratón	Monoclonal	IgG1 k	BD pharmingen (EE.UU)
B-Ly4-PE	CD21 humano	Ratón	Monoclonal	IgG1 k	BD pharmingen (EE.UU)
GaM-APC	Igs murino	Cabra	Policlonal		BD Pharmingen (EE.UU)
GaM IgG2a-PE	Cadena pesada de IgG2a murino	Cabra	Policlonal		SouthernBiotech (EE.UU)
GaM IgG2b-PE	Cadena pesada de IgG2b murino	Cabra	Policlonal		Molecular probes (Reino Unido)
R19-15-FITC	IgG2a murino	Rata	Monoclonal	IgG1	BD Pharmingen (EE.UU)
R6-60.2-FITC	IgM murina	Rata	monoclonal	IgG2a	BD Pharmingen (EE.UU)
RaM-Biotina	Igs murino	Conejo	Policlonal		Dako (Dinamarca)
RAM	Igs murino	Conejo	Policlonal		Dako (Dinamarca)
RaM-FITC	Igs murino	Conejo	Policlonal		Dako (Dinamarca)
RaM-HRP	Igs murino	Conejo	Policlonal		Dako (Dinamarca)
RaM-PE	Igs murino	Conejo	Policlonal		Dako (Dinamarca)
Tük4	CD14 humano	Ratón	Monoclonal	IgG2a	Dako (Dinamarca)
Tük4-FITC	CD14 humano	Ratón	Monoclonal	IgG2a	Serotec (Reino Unido)

Tabla 3. Anticuerpos comerciales utilizados en esta tesis

3.1 Producción de sobrenadantes de cultivo.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (AcMo) obtenidos en nuestro laboratorio según el protocolo descrito por Kohler y Milstein (Kohler, G et al. 1975), se crecieron en frascos de cultivo de 75 o de 175 cm² (Labclinics, España), según el volumen necesario para realizar los estudios posteriores. Las células se cultivaron en medio RPMI completo; además, este medio de cultivo fue suplementado con piruvato sódico 2mM en caso de que el hibridoma fuera obtenido de una fusión realizada con la línea de mieloma X63/Ag 8.653, o con OPI

(oxalacetato 1,1mM, piruvato sódico 0,45 mM e insulina bovina 0,04 U/ml) si la línea de mieloma fue Sp2/0-Ag 14.

Para facilitar la posterior purificación de los AcMo a partir de los sobrenadantes en columnas de proteína G, los hibridomas se adaptaron progresivamente a medio EX-CELL sin suero (Serum free hybridoma médium, Sigma, EE.UU).

3.2 Cuantificación de anticuerpos presentes en el sobrenadante de cultivo por ELISA.

Para cuantificar los anticuerpos se tapizaron placas de 96 pocillos de fondo plano polysorp (Nunc, Dinamarca) con 100 µl de una dilución en PBS (10 µg/ml) de un anticuerpo de conejo anti-Ig de ratón, y se incubaron 24 horas a 4°C. A continuación se realizaron 6 lavados con PBS con tween 20 al 0.5% (Merck, Alemania) (Tampón lavado ELISA) y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con PBS con BSA al 1% (Sigma, EE.UU) (Tampón bloqueo ELISA). Tras otros 6 lavados se incubaron durante 1 hora a TA con diluciones seriadas de los sobrenadantes de los hibridomas a cuantificar, utilizando como diluyente PBS con BSA 0,1% y tween 20 al 0,01% (Tampón de dilución de ELISA). Se estableció una curva patrón empleando anticuerpos purificados de concentración conocida y del mismo isotipo. Después de 6 lavados se incubaron durante 1 hora a TA con RaM-HRP (Ver Tabla 3), se volvió a lavar y se añadió el sustrato, O-fenildiamina (OPD) (Sigma, EE.UU), previamente disuelto en tampón citrato-fosfato pH 5 (NaH_2PO_4 0,2M y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0,1M) con H_2O_2 al 0,001%. La reacción se frenó con H_2SO_4 2N, cuantificándose la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 492 nm.

3.3 Purificación de AcMo.

La purificación de los AcMo de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas, se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad en columnas de proteína G-Sepharosa 4 *Fast Flow* (GE Healthcare, Suecia). La resina se hidrató en PBS, se empaquetó en una columna, y se equilibró con tampón fosfato sódico 20mM pH 7,0 (tampón de unión). La muestra, previamente diluida al 50% en este mismo tampón, se aplicó sobre la columna, eliminándose las proteínas no unidas mediante lavados con dicho tampón. Las Igs unidas a la resina de proteína G, se eluyeron con una

solución de glicina-HCl 0,1M pH 2,7 (tampón de elución), recogiendo fracciones de 1 ml, las cuales, una vez neutralizadas con Tris-HCl pH 9,0 y cuantificadas por espectrofotometría, se sometieron a diálisis frente a PBS. La concentración de inmunoglobulina de cada fracción se determinó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 nm.

3.4 Marcaje de los AcMo.

3.4.1 Marcaje con Biotina

Los AcMo purificados se dializaron frente a bicarbonato sódico 0,1 M pH 8,3 y se ajustó su concentración a 1 mg/ml.

Por cada mg de la solución de AcMo se añadieron 125 µg de una solución de N-hidroxi-succinimida-biotina (Sigma, EE.UU), disuelta en DMSO. A continuación la mezcla se mantuvo en agitación durante 4 horas a TA dializándose después frente a PBS.

3.4.2 Marcaje con fluorocromos

El marcaje se realizó mediante kits comerciales (Kit ALEXA FLUOR 633 o Kit ALEXA FLUOR 488), siguiendo las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, EE.UU). Los AcMo purificados y dializados frente a PBS se ajustaron a una concentración de 2 mg/ml. A continuación se añadieron 50 µl de bicarbonato sódico 1 M pH 8,3 por cada mg de anticuerpo. Un mg de anticuerpo se transfirió a un vial que contenía el fluorocromo, incubándose en agitación durante 1 hora a TA. La reacción se detuvo añadiendo a la mezcla 15 µl de hidroxilamina pH 8,5 e incubándose durante 15 minutos a TA. El anticuerpo marcado se separó del fluorocromo libre mediante cromatografía de exclusión molecular, utilizando PBS como tampón de elución.

Los anticuerpos conjugados se conservaron a - 20°C con 0,005% de Thimerosal como agente antimicrobiano.

4. CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1 Análisis de las células con un solo color.

Las células (25×10^4 /pocillo) se lavaron dos veces con PBS con BSA al 0,1% y con azida sódica al 0,01% (tampón de citometría, TC) y se repartieron en placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar, Inglaterra).

En los marcajes simples indirectos las células se incubaron a 4°C durante 30 minutos con 50 µl/pocillo de sobrenadante del hibridoma. Después de dos lavados con TC, las células se incubaron con una solución de fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón (RaM) conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alofococianina (APC) (Ver Tabla 3), durante 30 minutos a 4°C protegiendo la placa de la luz. Tras dos lavados, las células se fijaron con formaldehído al 0,1%, (Tampón fijador, TF).

En los marcajes simples directos, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con 50 µl de AcMo purificado y marcado con Alexa 488, Alexa 633 o con biotina. En este último caso, después de dos lavados con TC, las células se incubaron con estreptavidina-PE o estreptavidina-PerCP (peridina clorofila) (Sourthen Biotechnology, EE.UU.) durante 30 minutos. Tras varios lavados se resuspendieron en TF para su análisis.

Como control negativo se utilizaron AcMo irrelevantes del mismo isotipo sin marcar, marcados con Alexa 488, Alexa 633 o con biotina según el protocolo utilizado.

4.2 Análisis de las células con varios colores.

Para realizar los marcajes múltiples procedimos inicialmente como en un marcaje simple, empleando como anticuerpo secundario RaM-FITC o RaM-PE. Después de dos lavados, las células (3-4 X 10⁵/pocillo) se incubaron durante 10 minutos con 25 µl de TC con 5% suero normal de ratón, con objeto de bloquear los sitios de unión residuales del RaM. Sin eliminar el suero de ratón se añadieron los AcMo marcados con Alexa 488, Alexa 633 o biotina. En este último caso las células se lavaron dos veces y se incubaron con estreptavidina-PE o estreptavidina-PerCP durante 30 minutos. Tras dos lavados las células se resuspendieron en TF para su análisis.

4.3 Adquisición de datos en el citómetro y análisis de los resultados

Las suspensiones celulares teñidas con los diferentes AcMo se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, EE.UU). Los fluorocromos empleados fueron: FITC o Alexa 488 (detectado en el canal FL-1), PE (FL-2), PercP (FL-3) y APC ó Alexa 633 (FL-4).

Antes de la adquisición de los datos en el citómetro, se fijaron las condiciones óptimas de adquisición analizando suspensiones celulares control sin teñir para fijar los umbrales mínimos de sensibilidad y autofluorescencia. Se emplearon también

controles de isotipo y controles positivos marcados en un solo color y dos colores con el fin de fijar la compensación de las fluorescencias (% FL1 - % FL2, %FL2 - %FL1, %FL2 - %FL3, %FL3 - %FL2, %FL3 - %FL4, %FL4 - %FL3). El número de células analizadas varió dependiendo del tipo de ensayo entre 5×10^3 y 5×10^4 .

El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa WinMDI (Desarrollado por Joseph Trotter, URL <https://facs.scripps.edu/>). Los porcentajes de células positivas se determinaron con respecto al control negativo de cada muestra.

Para eliminar del análisis las células muertas se realizaron tinciones con yoduro de propidio (FL2) ($0,5 \mu\text{g IP}/5 \times 10^5$ células) sobre células no fijadas.

5. SEPARACIÓN MAGNÉTICA DE POBLACIONES CELULARES.

La separación de las distintas poblaciones celulares se llevó a cabo utilizando el sistema AutoMacs (Miltenyi Biotec, Alemania). Este sistema permite la separación automatizada de células empleando microesferas magnéticas adheridas a su superficie celular mediante anticuerpos. Esta tecnología está diseñada tanto para una selección positiva, como para la eliminación de las células marcadas magnéticamente (selección negativa), haciéndolas pasar por una columna acoplada a un imán.

5.1 Monocitos

Para obtener una suspensión de monocitos se eliminaron los linfocitos de las PBMC totales, usando un cóctel de anticuerpos a concentración saturante. Para ello, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con una mezcla de los AcMo anti-CD3, anti-CD45RA y anti-CD8 α (Ver Tabla 2). Posteriormente se lavaron dos veces con PBS, SFB 5%, Azida 0,1% y EDTA 2,5mM (tampón separación, TS) y se incubaron durante 15 minutos a 4°C con microesferas magnéticas ligadas a anticuerpos de cabra anti-Igs de ratón (Miltenyi Biotec, Alemania). La suspensión celular se lavó y pasó por una columna de separación AutoMacs. La fracción no retenida se recogió y se analizó mediante citometría de flujo empleando el AcMo anti-CD172a (Ver Tabla 2). La riqueza de los monocitos fue mayor del 90%.

5.2 Separación de la población CD14⁺SLA-II⁻CD163⁻

Los monocitos enriquecidos fueron incubados durante 30 minutos en hielo con una mezcla de AcMo anti-CD163 y anti-SLA-II (ver tabla 2). Después de lavar dos

veces con TS se incubaron 30 minutos en hielo con RaM-PE. Posteriormente las células se incubaron durante 15 minutos en hielo con microesferas magnéticas conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti-PE (3µl de micropartículas por cada 10^7 células). Las células se lavaron una vez y se pasaron por una columna de separación AutoMACS. De esta forma se eliminaron los monocitos que expresaban estos marcadores (Figura 11). La fracción no retenida se analizó por citometría de flujo, comprobándose que más del 95% de las células eran monocitos $CD14^+SLA-II^-CD163^-$.

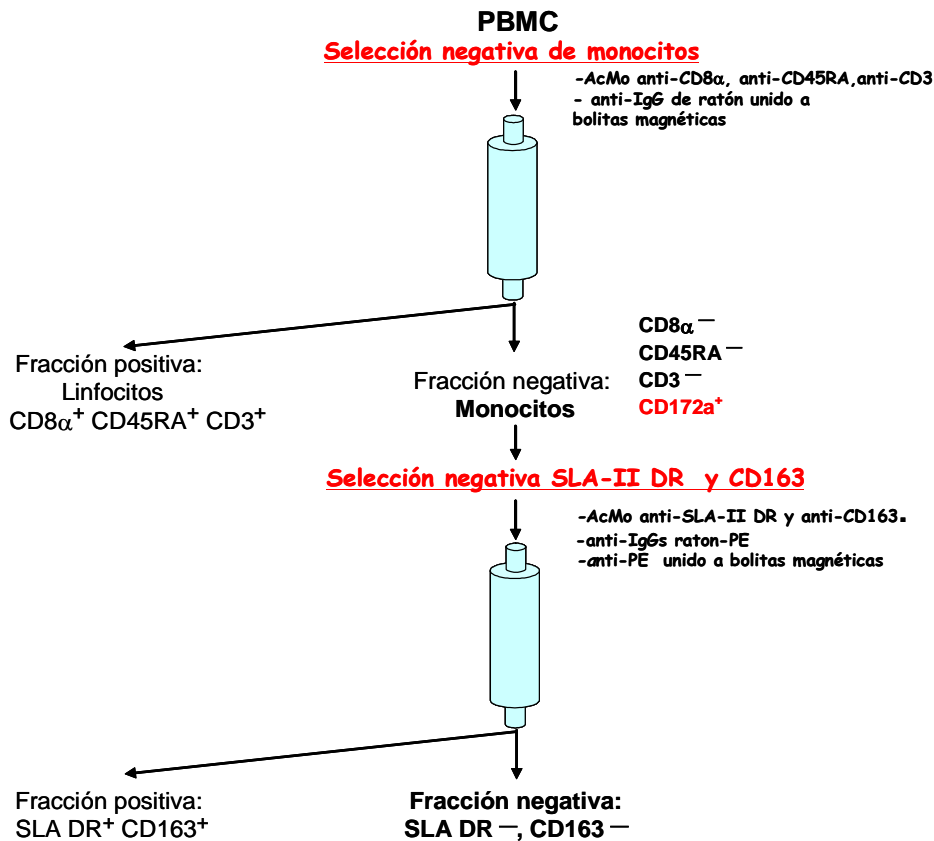


Figura 11. Esquema de la separación de las células $CD163^-$ $SLA-II^-$

5.3 Separación de la población $CD14^-SLA-II^+CD163^+$

La fracción enriquecida en monocitos se incubó durante 30 minutos en hielo con el AcMo anti- $CD14$. Después de dos lavados se incubó durante 30 minutos en hielo con RaM-Biotina. Posteriormente se incubó con estreptavidina-PE durante 30 minutos y después de otros dos lavados se añadieron microesferas anti-PE y se incubaron 15 minutos en hielo. La suspensión celular se pasó por una columna de separación AutoMACS para eliminar las células que expresaban $CD14$.

Para obtener las células $CD163^+$, la suspensión de células $CD14^-$ se incubó posteriormente con el AcMo anti- $CD163$ durante 30 minutos en hielo, luego con RaM-FITC durante 30 minutos en hielo y por último con microesferas conjugadas con

anticuerpo monoclonal anti-FITC (3µl de microesferas por 10^7 células) durante 15 minutos en hielo. Tras esta incubación las células se lavaron una vez y se pasaron por una columna de separación AutoMACS, realizando una selección positiva de las células CD163⁺ (Figura 12). Esta última suspensión celular se analizó por citometría de flujo, comprobando que más del 95% de las células eran monocitos CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺.

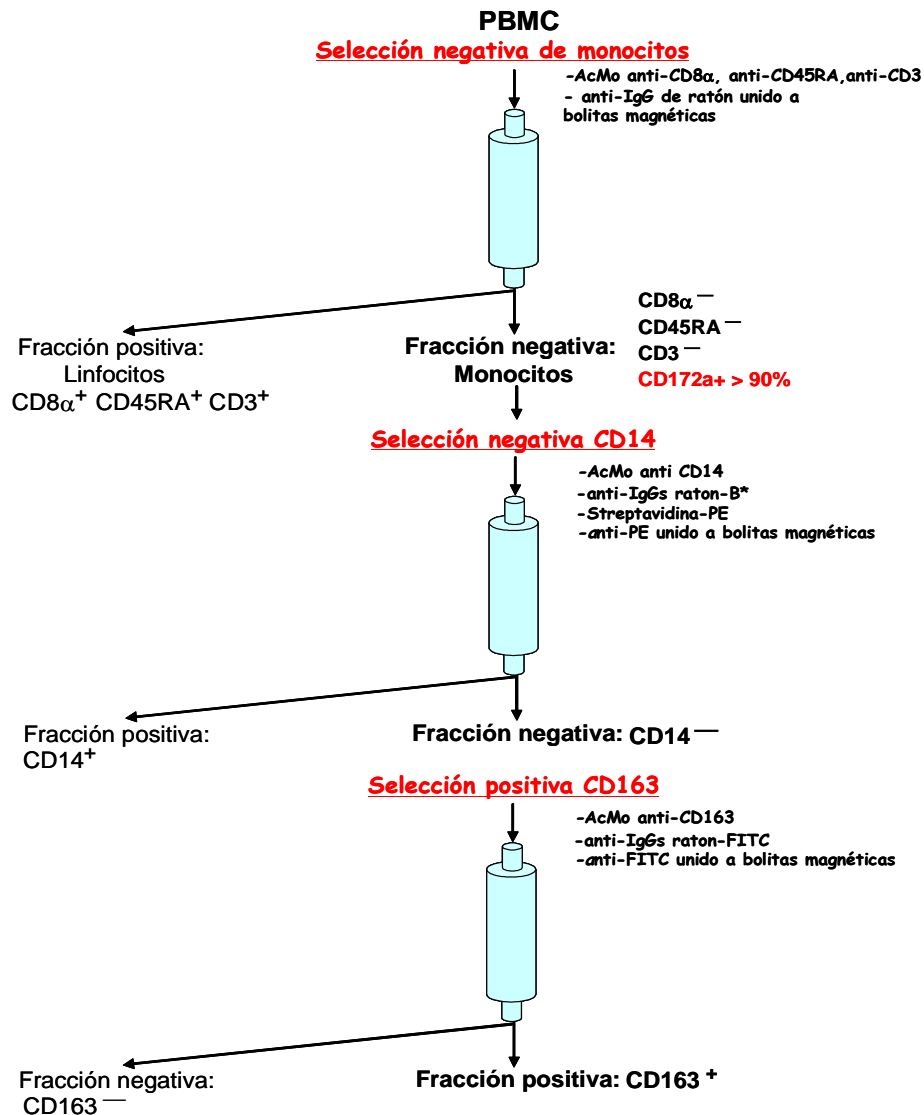


Figura 12. Esquema de la separación de las células CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺

6. VIRUS DEL SÍNDROME RESPIRATORIO Y REPRODUCTIVO PORCINO (VSRRP)

Todos los experimentos de proliferación se realizaron con la cepa 5710 del virus del SRRP, aislada en el Norte de España en 1992 y proporcionada por el Dr. José M^a Castro (Facultad de Veterinaria, UCM).

6.1 Producción del virus del SRRP

El virus se cultivó en células de la línea de riñón de mono MARC-145 en medio DMEM completo. Cuando la confluencia del tapiz alcanzó un 80% se retiró el medio y se añadió un inóculo del virus de SRRP a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. Después de 1 hora de adsorción a TA, se añadió medio sobre el inóculo hasta completar el volumen de cultivo del frasco. Transcurridos 3-4 días de cultivo, cuando se observó efecto citopático en más del 80% de las células, los frascos de cultivo se congelaron y se descongelaron 3 veces consecutivas. El homogeneizado celular resultante se centrifugó a 300 g durante 5 min, para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se dividió en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su posterior utilización. En paralelo se produjo inóculo control (MOCK), tratando con el mismo protocolo a las células MARC-145 sin infectar. Este inóculo MOCK se utilizó como control negativo.

6.2 Titulación del virus del SRRP.

Los distintos lotes de virus se titularon en la línea celular MARC-145. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos (Labclinics, España) y se añadieron 10^4 células a cada pocillo en DMEM completo. Tras cultivar las células durante 24 horas, se retiró el sobrenadante y se añadieron diluciones seriadas en base 10 del virus, utilizando el mismo medio de cultivo. Los cultivos celulares se mantuvieron en el incubador, realizándose la lectura de las placas a los 7 días de la infección para valorar el efecto citopático. El título del virus se calculó utilizando el método descrito por Reed y Muench (1938), expresándose en forma de $DICT_{50}/ml$.

7. PRODUCCIÓN DE LAS PROTEINAS DE FUSIÓN

7.1 Extracción de RNA

El RNA de monocitos se extrajo utilizando una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol (*Tripure Isolation Reagent*, Roche Diagnostics, Alemania) (Chomczynski, P et al. 1987). Tras 5 min de incubación a TA con este reactivo para lisar las células y asegurar la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas, se añadió cloroformo y se centrifugó, obteniéndose tres fases. Se recogió la fase superior, que contenía el RNA, y éste se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 75% para eliminar las sales. El RNA se secó y se disolvió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, EE.UU). Las muestras se conservaron a -70°C hasta su utilización.

7.2 Obtención del cDNA

El RNA se desnaturalizó a 65°C durante 2 min y posteriormente se mantuvo en hielo para evitar su renaturalización. La retrotranscripción del RNA total (de 1 a 4 µg) se realizó con una mezcla que contenía 25 U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Epicentre Technologies, EE.UU), Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM (Epicentre Technologies, EE.UU), 125 µM de cada uno de los dNTPs (Epicentre Technologies, EE.UU), 20 U del inhibidor de RNAsas (RNasin inhibitor, Promega, EE.UU.) y 20 pmoles del oligonucleótido poli dT. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y el cDNA que se obtuvo se guardó a -20°C.

7.3 Amplificación de la secuencia de nucleótidos que codifica las quimioquinas porcinas CCL2 y CCL19 y el receptor CCR7 (PCRs)

Las parejas de oligonucleótidos empleadas para la amplificación de las distintas secuencias, así como su temperatura de hibridación (T_{AN}) y el tamaño de los productos amplificados, se muestran en la Tabla 4:

Gen	Cebador	Secuencia	T_{AN} °C	pb
CCL2	CCL2-F	CCTCATCCTCCAGCATGAAGGTCTCTGC	62	328
	CCL2-R	GGTGGAGTCAGGCTTCAAGGCTTCGG		
CCL2-V5-HIS	CCL2-F	CCTCATCCTCCAGCATGAAGGTCTCTGC	62	312
	CCL2V5HR	AGGCTTCGGAGTTTGGTTTTCTTGTCAGG		
CCL2-GFP	CCL2-F	CCTCATCCTCCAGCATGAAGGTCTCTGC	62	313
	CCL2GFPR	GAGGCTTCGGAGTTTGGTTTTCTTGTCAGG		
CCL19-GFP	CCL19GFP-F	CGCTTGCTGAGAGTCTGCTCACCCTG	65	329
	CCL19GFP-R	GCTAAGAGCAAGCACCACCGCAACC		
CCL19-Fc	XbaCCL19F	GCGCTCTAGACGCTTGCTGAGAGTCTGCTCACCCTG	68	326
	XbaCCL19R	GCGCTCTAGAGTTGCGGTGGTGGTCTGCTTTAGC		
CCR7-GFP	CCR7ATG-F	GCCAAGAGTGACATGGACCTGG	61	1141
	CCR7GFP-R	GGGGGGAGAAGGTGGTGG		

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados, temperaturas de hibridación y tamaño de los productos.

7.3.1 CCL2

La secuencia que codifica la quimioquina porcina CCL2 se amplificó mediante RT-PCR utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos (CCL2F y CCL2R) diseñados en base a la secuencia con nº de acceso NM_214214 y como molde cDNA de monocitos CD172a⁺ obtenidos por aislamiento inmunomagnético. Esa pareja de oligonucleótidos contienen uno el codón de inicio y otro el codón de terminación.

El molde de cDNA (2 μ l) obtenido en la reacción RT se usó en un volumen final de 25 μ l de mezcla de PCR consistente en: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,005% Tween 20, 0,005% de NP-40, 1 mM MgCl₂, 50 μ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada oligonucleótido y 1 U de la polimerasa termoestable DyNAzyme II (Finnzymes, Finlandia).

Posteriormente, se diseñaron 2 nuevos oligonucleótidos antisentido (CCL2V5HR y CCL2GFPR) para clonar la ORF completa del CCL2 y expresarla como proteína de fusión con el epítipo V5 y un “tag” de histidinas o con la proteína GFP. Las amplificaciones se llevaron a cabo usando la DNA polimerasa DyNAzyme II con el cebador 5'CCL2F y el correspondiente cebador 3'y como molde el DNA plasmídico purificado de la construcción anterior. Las condiciones de las PCR se detallan en la figura 13:

PCR		
Tª	Tiempo	Ciclos
94	10min	1
94	45seg	35
62	45seg	
72	45seg	
72	10min	1

Construcciones
CCL2
CCL2-V5-HIS
CCL2-GFP

Figura 13. Condiciones de las PCR para amplificar las construcciones con CCL2.

7.3.2 CCL19

La secuencia que codifica la quimioquina porcina CCL19 (nº de acceso GenBank NM_006274) se amplificó por PCR utilizando como molde una construcción cedida por el Dr. Hirohide Uenishi (Department of Animal Breeding and Genetics, National Institute of Animal Industry, Ibaraki, Japón) que contenía el cDNA del CCL19 porcino clonado en el plásmido pCMVFL3. Para ello, se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos (CCL19-GFP-F y CCL19-GFP-R) que nos permitió clonar esta secuencia en fase con la que codifica la GFP incluida en el plásmido pcDNA3.1/ CT-GFP-TOPO, con objeto de expresar posteriormente la proteína de fusión. Además se diseñó otra pareja de oligonucleótidos (XbaCCL19F y XbaCCL19R) que contenían la secuencia para la endonucleasa de restricción XbaI, para subclonar esta secuencia en fase con la que codifica la porción Fc de la Ig G1 humana en una construcción previamente obtenida en nuestro laboratorio (pcDNA-Fc). Las condiciones de las PCRs se detallan en la figura 14.

CCL19-GFP			CCL19-Fc		
Tª	Tiempo	Ciclos	Tª	Tiempo	Ciclos
94	10min	1	95	5min	1
94	45seg	35	95	30seg	5
65	45seg		61	30seg	
72	45seg		72	30seg	
72	10min	1	95	30seg	25
			68	30seg	
			72	30seg	
			72	10min	1

Figura 14. Condiciones de PCR para las construcciones de CCL19.

7.3.3 CCR7

A partir de una construcción cedida por el Dr Hirohide Uenishi que contenía la secuencia nucleotídica que codifica el receptor CCR7 porcino (nº de acceso GenBank: AB090872) en el plásmido pCMVFL3, se subclonó esta secuencia en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO. Para ello se diseñó una pareja de oligonucleótidos (CCR7ATG-F y CCR7GFP-R. Tabla 4) que nos permitió amplificar por PCR la secuencia de interés para expresarla en fase con la proteína GFP. Las condiciones de la PCR se detallan en la figura 15.

CCR7-GFP		
Tª	Tiempo	Ciclos
94	10min	1
94	45seg	35
61	45seg	
72	45seg	
72	10min	1

Figura 15. Condiciones de PCR para la construcción de CCR7-GFP

7.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se analizaron mediante separación electroforética en geles de agarosa en tampón Tris-Acetato. Para ello, las muestras se mezclaron debidamente con tampón de carga 10X (Ficoll 400 20%, EDTA 100mM, Orange G 0,025%), y se cargaron en diferentes pocillos de un minigel de agarosa (Promega, EE.UU.), cuya concentración varió entre el 1 y el 2% dependiendo del tamaño del amplicón, preparado en TAE 1X (Tris Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma,

Para purificar los productos específicos de PCR, las muestras se mezclaron con tampón de carga y se resolvieron en minigeles de agarosa de bajo punto de fusión a la concentración adecuada en TAE 1X con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Promega, EE.UU.). La electroforesis se realizó a 70 V utilizando como tampón TAE 1X. Posteriormente, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se procedió a cortar las bandas de interés usando como referencia de tamaño un patrón de peso molecular de tamaño conocido cargado en paralelo. A continuación, se purificó el DNA mediante el kit QUIAquick gel extraction (Quiagen, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Para el clonaje de los diferentes fragmentos de DNA utilizamos distintos plásmidos.

El plásmido pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, EE.UU) es un vector de expresión eucariota de 5,4 Kb que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV). La secuencia de la ORF7 del virus del SRRP fue clonada previamente en nuestro laboratorio entre las dianas de restricción BamHI y XbaI del sitio de clonaje múltiple de dicho plásmido. Esta secuencia aparece precedida por un espaciador (sp).

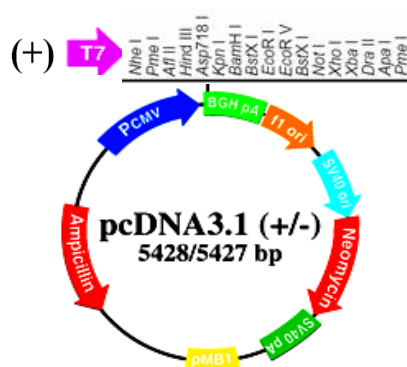


Figura 16. Diagrama del plásmido de expresión eucariota pcDNA3.1 (+/-).

El vector de expresión eucariota pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, EE.UU.) se utilizó para el clonaje de los fragmentos de DNA obtenidos por RT-PCR (Figura 17). Este plásmido lleva unida de forma covalente una topoisomerasa (vector activado) que estabiliza el complejo y, gracias a su actividad ligasa, permite insertar directamente el

recomendaciones descritas para cada una. En el caso de las digestiones simples de los vectores se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina (Rapid Alkaline Phosphatase, Roche, EE.UU.) durante 20 minutos a 37°C, para evitar que el vector linearizado se pudiera recircularizar, y una posterior inactivación de la enzima a 65°C durante 15 minutos.

A continuación, los productos de las digestiones se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se purificaron como se describe en el apartado 7.5.

7.8 Ligación

Para incorporar el cDNA que codifica el CCL2 porcino en el plásmido pcDNA3.1/V5-His TOPO, y las secuencias que codifican CCL2, CCL19 y CCR7 en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO se mezcló el DNA purificado (Ver apartado 7.4) con el plásmido correspondiente y con una solución salina suministrada en el kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla se incubó a TA durante 5 minutos.

Para la ligación del cDNA del CCL19 en el plásmido pcDNA-Fc, previamente digeridos con XbaI y purificados ambos, se utilizó la Ligasa T4 (Promega, EE.UU.).

La relación molar inserto:vector varió entre 1:1 y 1:3 y la cantidad de plásmido fue de 50 o de 100 ng. La reacción se realizó a 16°C durante 18 horas, tras lo cual se procedió a la transformación de bacterias competentes.

7.9 Transformación de bacterias competentes

Para llevar a cabo las transformaciones con las diferentes construcciones se descongelaron en hielo bacterias comerciales, químicamente competentes, de la cepa *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, EE.UU.), se añadió la mezcla procedente de la ligación (2 µl) y se incubó la reacción durante 25 min en hielo. Seguidamente se sometieron a un choque térmico durante 30 segundos a 42°C en baño sin agitación, e inmediatamente después se incubaron en hielo 2 min. Tras añadir a las bacterias medio de cultivo SOC (bactotripton 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, NaCl 0,5 g/l, 4 ml de glicerol /l, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 2mM) atemperado, se incubaron 1 hora a 37°C en un agitador horizontal (180 rpm). A continuación se sembraron diferentes cantidades de las células transformadas en placas de agar Luria Bertani (LB, bactotripton 5 g/l (Becton Dickinson, Francia), extracto de levadura 2,5 g/l (Serva,

Alemania), NaCl 5 g/l y agar 15 g/l) con ampicilina (1mg/l), como antibiótico de selección y se incubaron durante 18 horas en una estufa a 37°C.

7.9.1 Selección de colonias

Para seleccionar clones de bacterias que contenían el plásmido con el inserto correctamente orientado, se aislaron varias colonias resistentes a ampicilina resultantes de la transformación, y cada una de ellas se resuspendió en 20 µl de la mezcla de reacción para realizar una PCR en las condiciones que se detallan en la Figura 19.

Según la construcción con la que se hubieran transformado las bacterias, se utilizaron parejas de oligonucleótidos que hibridaban en uno de los extremos del sitio de clonaje (5'T7, 3'BGH o 3'GFP) combinados en el inserto con el oligonucleótido correspondiente. Las secuencias de estos cebadores aparecen en la Tabla 5.

Oligonucleótido	Secuencia	T _F °C
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	53.2
BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	55.9
GFP reverse	GGGTAAGCTTCCGTATGTAG	57.1

Tabla 5. Secuencias y temperaturas de fusión de los oligonucleótidos utilizados para seleccionar las colonias de bacterias positivas

7.9.2 Extracción y purificación de plásmidos

Para la purificación de los diferentes plásmidos se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. A partir de cultivos de bacterias de 3 ml en medio LB con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma, EE.UU) se obtuvieron 30 µl de plásmido con una concentración entre 200 y 400 µg/ml.

La obtención de grandes cantidades de plásmidos libres de endotoxinas, para la inoculación de los cerdos, se realizó con el kit EndoFree Plasmid Giga (Quiagen, Alemania), aplicando el protocolo recomendado. A partir de un cultivo de 2,5 l de bacterias en medio LB con 50 µg/ml de ampicilina se obtuvieron aproximadamente entre 4 y 7 mg de plásmido.

7.9.3 Secuenciación

La secuenciación del DNA se realizó en el laboratorio del Servicio Interdepartamental de Investigación (Universidad Autónoma de Madrid) o en Secugen S.L. (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid). La visualización de los datos de secuenciación se realizó mediante el programa informático Chromas

(desarrollado por Conor McCarthy en la Universidad Queensland, Australia y disponible en Internet en <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). La identidad de las secuencias y la ausencia de mutaciones se comprobaron mediante comparación con la secuencia de referencia, usando el programa BLAST y la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

La secuencia de DNA se tradujo a proteína utilizando el programa Wingen (desarrollado por Lars Henning en la Universidad de Friburgo, Alemania y disponible en Internet en <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/schaefer/lhennig/winpep1.html>). Y se comprobó que las secuencias no contenían ningún codón de terminación y que estaban en fase con la secuencia de la GFP, con la de V5-HIS o con la de la porción Fc.

La presencia de péptido señal se predijo utilizando el servidor SignalP 3.0 de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU), aplicando el modelo de predicción eucariota HMM (Hidden Markov models).

7.10 Obtención de los clones que expresan de forma estable las proteínas de fusión.

Para expresar las quimioquinas recombinantes fusionadas a GFP o a Fc, se realizaron transfecciones de células CHO con los plásmidos descritos utilizando LipofectAMINE PLUS Reagent (Invitrogen, EE.UU). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Labclinics, España) con DMEM completo y los cultivos se mantuvieron en incubador a 37°C, 5% de CO₂ y ambiente húmedo. Cuando las células alcanzaron el 50% de confluencia se llevó a cabo la transfección. Se añadieron cantidades de plásmido que variaron entre 200 y 400 ng por pocillo, con 6 µl de Plus Reagent en medio de transfección, libre de suero y antibióticos, y se incubaron durante 15 minutos a TA. A continuación, se añadió a la mezcla 4 µl de lipofectamina diluida en este mismo medio hasta un volumen total de 1ml. Después de 15 min de incubación, los complejos DNA/lipofectamina se añadieron a las células. Éstas se cultivaron durante 4 horas en estas condiciones, transcurridas las cuales se suplementó el medio con 5% de SFB. Pasadas 24 horas se procedió a analizar la expresión de la proteína correspondiente. Para ello se realizó un tratamiento de 4 horas con 2 µg/ml de monensina (Sigma, EE.UU), con el objeto de inhibir la secreción de la proteína al medio extracelular. Pasado ese tiempo, las células se despegaron con PBS con EDTA 10 mM y se llevó a cabo el análisis de la expresión de la proteína de fusión mediante citometría de flujo. Las quimioquinas fusionadas a GFP son detectadas directamente por

citometría. Mientras que para detectar la quimioquina fusionada al Fc de IgG1 humana, las células fueron permeabilizadas con metanol a -20°C durante 10 min y posteriormente incubadas durante 30 min con el anticuerpo anti-IgG-FITC (Ver Tabla 3). En todos los casos el control negativo empleado fueron las células CHO no transfectadas tratadas de la misma forma.

Para la obtención de los clones estables, las células transfectadas se mantuvieron 10 días en cultivo con medio de selección con geneticina (0,8 mg/ml) (Gibco, Gran Bretaña). Pasado ese tiempo se comprobó la expresión de las proteínas de interés y se obtuvieron clones por dilución límite, en los que se volvió a comprobar la expresión de las proteínas.

7.11 Western-blot y Dot-blot

Las células CHO transfectadas con los plásmidos se trataron durante 4 horas con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de monensina (Sigma, EE.UU). Posteriormente se trataron con tampón de lisis (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NP40 1%, pH 7,4, 1 mg/ml de BSA, PMSF 1mM y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina) durante 20 min en hielo. Tras centrifugar los lisados, se recogió el sobrenadante.

Por otra parte el sobrenadante del cultivo celular, se recogió y se centrifugó para eliminar los restos celulares.

Las proteínas, tanto del sobrenadante de cultivo como del lisado celular, se mezclaron con tampón de carga 4X (Tris-HCl 0,062M, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%) y se calentaron a 95°C durante 5 min. Las muestras se cargaron en geles SDS-PAGE de diferentes porcentajes de poliacrilamida (Sigma, EE.UU.) y se realizó la electroforesis durante 1h y 30 min a 120V. Las proteínas así separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, EE.UU.) en tampón de transferencia (Tris HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM y 20% de Metanol), a 250 mA durante 75 min a 4°C , mediante electrotransferencia. Los sitios de unión inespecífica de las membranas se bloquearon sumergiendo estas en una solución de PBS BSA 3% y tween-20 0,2% durante toda la noche a 4°C (tampón de bloqueo WB). A continuación, se lavaron 3 veces con PBS BSA 1%, tween-20 0,2% (tampón de lavado WB) y se incubaron durante una hora, con el AcMo anti-GFP-biotina o con el anticuerpo anti-hIgG-biotina, según la construcción (ver tabla 3). Posteriormente se realizó una incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa. La actividad peroxidasa se visualizó utilizando el reactivo ECL (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Suecia). Para determinar los pesos moleculares de las bandas específicas, éstas se compararon con

marcadores de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad, EE.UU.) cargados en el mismo gel.

Para los experimentos de Dot-blot los sobrenadantes de las líneas estables se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un aparato de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad cat. # 170-6545, EE.UU) conectado a una bomba de vacío, tal como recomienda el fabricante. Después de dos lavados con tampón de lavado de WB, se siguió el protocolo descrito anteriormente para el bloqueo y revelado de la membrana.

7.12 Inmunofluorescencia

Sobre placas de 24 pocillos se dispusieron cubreobjetos circulares de vidrio, previamente esterilizados, y sobre ellos se cultivaron las células de las líneas estables de las quimioquinas-GFP. Estas se crecieron en medio DMEM hasta formar una monocapa y se trataron con monensina durante 4 horas. Posteriormente se fijaron en metanol a -20°C durante 10 min a. Después de tres lavados en PBS, se incubaron durante 30 min a TA con el anticuerpo α -GFP-biotina. Posteriormente se lavaron en PBS y se añadió estreptavidina-FITC, durante 20 min a TA. Finalmente las preparaciones se montaron en medio acuoso FluorSave Reagent (Calbiochem, Alemania) para preservar la fluorescencia.

Las células de la línea de expresión CCR7-GFP se crecieron también sobre cubreobjetos circulares en medio DMEM hasta formar una monocapa al 50% de confluencia, se lavaron con PBS, se fijaron en metanol a -20°C durante 10 min y posteriormente se marcaron con Texas-Red X-phalloidin (Invitrogen, EE.UU.) 5 μl /pocillo, durante 20 min a TA. Las preparaciones se montaron como en el caso anterior.

7.13 Migración celular

La respuesta migratoria de las PBMCs, de los monocitos y de las células CHO o CCR7-GFP se determinó mediante un ensayo de quimiotaxis en cámaras Transwell (Corning, Lowell, MA, EE.UU) de 24 pocillos con un filtro de policarbonato de 5 μm de poro en el caso de las células sanguíneas, y de 8 μm en el caso de las líneas celulares. Las placas de migración fueron tratadas 18 horas antes de realizar la migración con 100 μl de fibronectina a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células ($3,5 \times 10^5$ por pocillo) fueron resuspendidas en RPMI con 1% BSA y HEPES 25mM (Medio de migración) y se añadieron a la

cámara superior de los pocillos Transwell. Los diferentes estímulos se añadieron a la cámara inferior.

Después de tres horas de incubación se recogieron las células que habían migrado a la cámara inferior. En el caso de las células de la línea celular, los filtros se trataron con PBS con EDTA 10 mM, para recuperar las células adheridas a ellos. Las células recuperadas se analizaron mediante citometría de flujo. Los ensayos se realizaron al menos por duplicado para cada una de las muestras. Dado que el flujo del citómetro puede no ser constante, añadimos en todas las muestras una cantidad fija de micropartículas CaliBRITE (BD biosciences, Bélgica), de esta forma, contando un número determinado de micropartículas podemos analizar las células presentes en un mismo volumen de todas las muestras, independientemente del flujo. Para confirmar la relación lineal entre el número de eventos adquiridos y el número de células totales en la muestra, se realizó la curva patrón que se muestra en la figura 20.

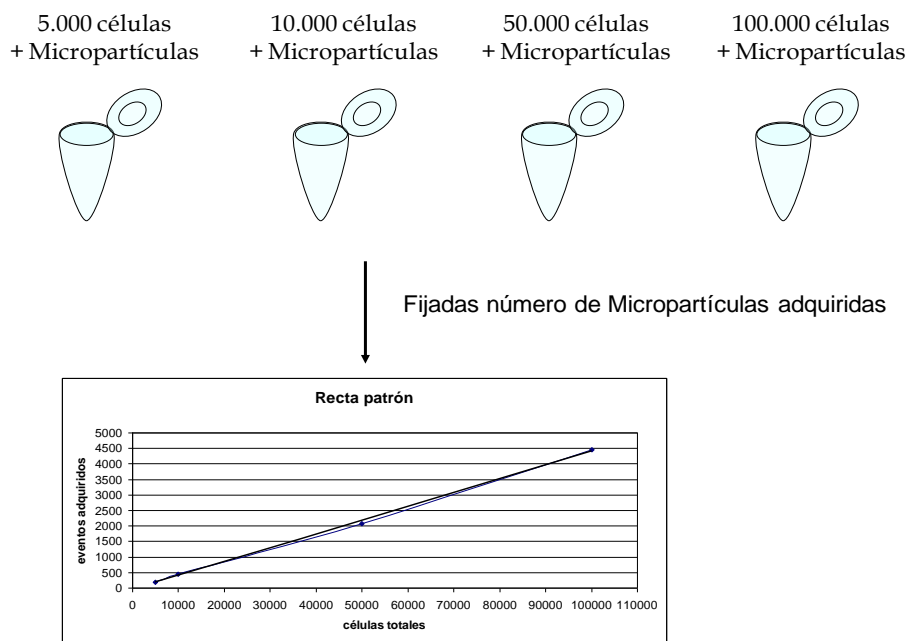


Figura 20. Esquema para calcular el número de células migradas.

7.14 Purificación de las proteínas de fusión con Fc

La purificación de las proteínas recombinantes fusionadas al fragmento Fc de IgG1 humana a partir de sobrenadantes de los clones que las expresan, se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en columnas de proteína A-Sepharosa (GE Healthcare, Suecia). La proteína A se hidrató en PBS, se empaquetó en una columna, y se equilibró con tampón glicina 1,5M, NaCl 3M, pH 8,9. La muestra, previamente diluida $\frac{1}{2}$ en este mismo tampón, se aplicó sobre la columna, eliminándose las proteínas no unidas mediante lavados con dicho tampón. Las proteínas de fusión

adsorbidas a la resina se eluyeron con una solución de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 0,1M pH 3, recogándose varias fracciones de 0,5 ml, las cuales se neutralizaron con 75 μ l de Tris-HCl 1,5M pH 8,8 y se cuantificaron por espectrofotometría y ELISA.

También se purificaron las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad en columnas con una matriz que contiene anticuerpos monovalentes de llama frente a la porción Fc de IgG humana (CaptureSelect human affinity matrix, BAC's CaptureSelect, Holanda). Se utilizaron diferentes tampones de elución (Tabla 6) para recuperar la proteína, que se recogió en diversas fracciones de 0,5ml.

Buffer	pH	Composición
Cítrico	2	Ac. Cítrico 0.1M
Glicina/HCl	2	Glicina 0.1M
Glicina /NaCl	2	Glicina 0.1M, NaCl 0,5M
Tris-acetato	7,7	Tris-acetato 0.1M, NaCl 2M
Glicina /NaOH	10	Glicina 0.1M, NaOH
DEA	11	DEA 50mM

Tabla 6. Tampones utilizados para eluir la proteína CCL19-Fc

7.15 Cuantificación de las quimioquinas-Fc

Las proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo y en las fracciones resultantes de las purificaciones mediante cromatografía de afinidad se cuantificaron mediante un ELISA puesto a punto en nuestro laboratorio. El protocolo es similar al descrito en el apartado 3.2, modificando los anticuerpos utilizados. Las placas se tapizaron con 5 μ g/ml de un anticuerpo generado en cabra, que reconoce fragmentos Fc de IgG humana y las muestras se revelaron con el anticuerpo policlonal de cabra anti-hIgG-biotina y posteriormente estreptavidina-HRP. También se estableció una curva patrón, en este caso empleando inmunoglobulina humana purificada.

8. ESTUDIO IN VIVO

8.1 Estudio del efecto adyuvante de CCL2 en vacunas DNA

Para el experimento in vivo de vacunación, se utilizaron 15 cerdos large White de 2 meses de edad. Se formaron 3 grupos de 5 cerdos cada uno: uno fue inmunizado con el plásmido de CCL2-GFP coadministrado con el de la ORF7 del virus de SRRP, otro con la ORF7 sola y otro con el plásmido pcDNA3.1 vacío. El número de cerdos por grupo

es suficiente para poder realizar un análisis estadístico y adecuado para que el número total de animales sea manejable en nuestras instalaciones.

Los cerdos se inyectaron en el músculo dorsal con las diferentes combinaciones de plásmidos realizándose tres inmunizaciones con un intervalo de dos semanas entre cada una de ellas. Las combinaciones de plásmidos se prepararon en 1ml de solución salina, utilizándose 500µg de cada uno de los plásmidos correspondientes. Los plásmidos estaban libres de endotoxinas.

A las semanas 4, 6, 8 y 11, tras la primera inmunización, se tomaron muestras de sangre para realizar los ensayos de linfoproliferación. Para determinar la presencia de anticuerpos se recogió suero de cada cerdo en las semanas 0, 2, 4, 6, 7, 8 y 11.

Los animales fueron vacunados con un virus inactivado del SRRP, cepa P120 (Progesis, Merial laboratorios S.A, España) dos semanas después de la última inoculación (semana 6) por vía intramuscular. A cada animal se le administró 2 ml de la vacuna que contenía trazas de gentamicina y excipiente oleoso con poliisobuteno hidrogenado como adyuvante.

8.2 Análisis de la proliferación de linfocitos T de los cerdos vacunados

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado, para ello, las células (3×10^5 PBMCs) se incubaron con diferentes cantidades de virus del SRRP (cepa 5710), (MOI de 0,7 hasta 0,0008).

Las células se mantuvieron en cultivo en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y ambiente húmedo durante 4 días y posteriormente se pulsaron con 1 µCi por pocillo de ³H-timidina (Perkin Elmer, EE.UU). La incorporación de ³H-timidina se determinó 18 horas después en un contador de centelleo microbeta² Plate Counter (Perkin Elmer, Finlandia), después de haber procesado las placas en un “FilterMate Cell Harvester” (Perkin Elmer, EE.UU).

8.3 Estudio de la respuesta humoral

Para la obtención de los sueros, la sangre de los animales se mantuvo 24 horas a 4°C para favorecer la formación del coágulo. Después se centrifugó 15 minutos a 250 x g y se recogieron los sueros. La presencia de anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína del virus del SRRP en esos sueros se determinó por ELISA. Para ello se utilizaron placas tapizadas con la proteína N del virus (Ingenasa, España) a las que se añadieron diferentes diluciones de los sueros procedentes de los distintos cerdos.

Después de una hora de incubación a 37°C y tras varios lavados se añadieron los anticuerpos secundarios específicos para Igs de cerdo

Para la detección de IgG total en los sueros, el anticuerpo, el tampón de lavado y la solución sustrato utilizadas fueron las proporcionadas por el kit *Ingezim PRRS Europa* (Ingenasa, España). La incubación con el anticuerpo fue de 45 min a TA mientras que el revelado se realizó durante 15 min a TA y se midió la D.O a una longitud de onda de 405 nm.

Para realizar la determinación de los isotipos de los anticuerpos frente a la nucleoproteína, se utilizaron anticuerpos frente a IgG1 e IgG2 porcinos (ver tabla 3). Estos anticuerpos están marcados con peroxidasa o con biotina. En este último caso es necesaria una incubación adicional con estreptavidina peroxidasa (Pierce, EE.UU). Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a TA, y tanto los sueros como los anticuerpos se diluyeron en PBS con BSA 0,1% y Tween-20 0,5%.

Para el revelado se utilizó OPD, de la manera descrita en el apartado 3.2

Como control negativo se empleó tampón de dilución.

Los datos obtenidos se expresan como D.O.

9. DETECCIÓN POR RT-PCR DE LA EXPRESION DEL RNA DE LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS.

A partir del RNA aislado de los PBMC, los monocitos y las poblaciones celulares aisladas se obtuvo el cDNA correspondiente según los protocolos descritos en los apartados 7.1 y 7.2. Los cDNA obtenidos se usaron como dianas para la detección por PCR de los distintos receptores de quimioquinas. Las parejas de oligonucleótidos empleadas en las diferentes PCR fueron diseñadas usando el programa Primer 3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) a partir de secuencias disponibles en la base de datos *Genebank*. Las secuencias de los cebadores, el tamaño de los productos amplificados y las condiciones empleadas para cada secuencia (T_{AN} y concentración de Mg^{2+}) se muestran en la tabla 7.

Todas las parejas de oligonucleótidos fueron diseñadas a partir de secuencias porcinas (mRNA) disponibles en las bases de datos, a excepción de CXCR3 y de CX₃CR1 cuyos cebadores se diseñaron en zonas conservadas de las secuencias de genes homólogos humanos. En el caso del CCR4 se hizo a partir de una secuencia EST porcina con alta homología. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se

indican en la tabla 7. La especificidad de los productos de PCR se confirmó mediante secuenciación del DNA.

Receptor	Oligos	Secuencia	T _{AN} °C	Producto (pb)	[Mg ⁺⁺] mM	Número acceso Gen bank
CCR4*	CCR4F	CTCCCTGAGAGCAAGGAC	52	712	1	BF081124
	CCR4R	CTCCAGGAAGAGCACCAC				
CCR7*	CCR7F	GGCTCAAGACCATGACCGAC		364	0.5	AB090356
	CCR7R	CCGATGAAGGCGTACAAG				
CX3CR1*	CX3CR1	CAACAGCAAGAAGCCCAAG		612	0.5	BC028078
	CX3CR1	AGCAGGGGGAGTAGGAAG				
CXCR3h*	CXCR3HF	GCCCTCTTCAACATCAACTTC		444	1.5	BC034403
	CXCR3HR	CAGCATCCACATCCGCTC				
CCR1	CCR1F	AAGGGCTATGATGCAACCAC	53	504	0.5	AB119268.1
	CCR1R	CTGGGTCTTGAAAAGTGGA				
CCR2	CCR2F	TTGTGTGACCCAAGAGAGACTTAG	58	529	1.5	AB119271.1
	CCR2R	GTTACAGCCAAACCATCTAAAGC				
CCR5	CCR5F	GCAATGAGAAGAAGAAGCACAAGG	55	493	1	AB119272.1
	CCR5R	GGAGCAGATGCCAACGGATAG				
CCR6	CCR6F	CTGGTGACGGCGTCAACCTG	60	191	2	DQ991099.1
	CCR6R	TTCACACACCACAGGCTTTCATGATC				
CXCR1	CXCR1F	TCCACCACCCCTTTGAGTA	52	365	1	NM_001001622.1
	CXCR1R	GACAGGTAGCGATGGATGGT				
CXCR4	CXCR4F	TTACACAGAGGATGACTTGGGCTC	57	707	0.5	AB116560.1
	CXCR4R	GGATGAGGATAACGGTGGTTT TG				

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las distintas secuencias. * (Alvarez, B et al. 2006).

El estado de cada cDNA se normalizó en relación al amplificado usando como referencia cebadores para las secuencias de la β -actina y la GADPH (Tabla 8). Se eligieron estos dos genes por su gran estabilidad en numerosos tejidos (Nygard, AB et al. 2007).

	Oligos	Secuencia	T _{AN} °C	Producto (pb)	[Mg ⁺⁺] mM
GADPH	GDPH-F	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG	55	285	0.5
	GDPH-R	AAGTTGTCATGGATGACCTTGCCA			
β -ACTINA	BACTIN-F	TGCTGTCCCTGTACGCCTCTG	55	220	2
	BACTIN-R	ATGTCCCGCACGATCTCCC			

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las secuencias de β -actina y de GADPH, para la normalización del cDNA.

Para cada pareja de oligonucleótidos se determinó empíricamente la cantidad de MgCl₂ (entre 0,5 y 2 mM) y se optimizaron las condiciones de la PCR (Figura 21),

empleándose una T_{AN} 5°C menor a la T_F más baja de cada pareja de oligonucleótidos. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo usando la DNA polimerasa DyNAzyme II y 10 picomoles de cada oligonucleótido.

PCR		
T^a	Tiempo	Ciclos
94	10min	1
94	45seg	35-45
T_{AN}	30seg	
72	1min	
72	10min	1

Figura 21. Condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias de los receptores de quimioquina

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa tal como se explica en el apartado 7.4

10. UNIÓN DE LAS QUIMIOQUINAS A SUS RECEPTORES

10.1 Unión de CCL2-GFP

El análisis de la capacidad de unión de la molécula quimérica CCL2-GFP a su receptor se realizó por citometría de flujo. Las PBMC o los monocitos ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo) se lavaron en TC y se incubaron durante 30 minutos en hielo con distintas diluciones de sobrenadante de la línea que expresa CCL2-GFP. Después de dos lavados las células se incubaron con un anticuerpo anti-GFP conjugado con Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU). Finalmente se lavaron y se fijaron con TF para su análisis.

Para caracterizar las poblaciones que unen CCL2, las PBMC o los monocitos separados se incubaron con 50µl/pocillo de sobrenadante de la línea CCL2-GFP. Después se realizaron marcajes dobles o triples con los anticuerpos α -CD14 (Tabla 3), α -CD163, α -SLA-II y α -CD172a (Tabla 2) como se indica en el apartado 4.2.

Para comprobar la especificidad de unión de CCL2-GFP, se incubaron las PBMC con 50µl/pocillo de sobrenadante de InvCCL2-GFP o 50µl/pocillo de sobrenadante de CCL2-V5-HIS durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se incubaron con el sobrenadante de CCL2-GFP durante 30 minutos a 4°C y se reveló con un anticuerpo anti-GFP conjugado con Alexa-488. Como control negativo de fluorescencia se utilizó

InvCCL2-GFP sin posterior marcaje con CCL2-GFP. Finalmente las células se lavaron y se fijaron con TF.

10.2 Unión de CCL19-Fc

El estudio de la unión del CCL19-Fc a su receptor se realizó por citometría de flujo. Las PBMC, los monocitos y las células CHO y CCR7-GFP ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo) se incubaron con 25 μ l de TC con 10% de SC, con objeto de bloquear los receptores para Fc de las células. Posteriormente se eliminó el SC y se realizó el protocolo de marcaje con varios colores, descrito en el apartado 4.2. Después de dos lavados, las células se incubaron con 30 μ l de proteína CCL19-Fc a una concentración de 10 μ g/ml durante 45 minutos a 4°C y se reveló con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con biotina y estreptavidina-PerCP. Finalmente se lavaron y se fijaron con TF para su análisis.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS EN SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS PORCINOS

Las diferentes poblaciones de leucocitos difieren en sus capacidades migratorias y en los receptores de quimioquinas que expresan, que también pueden ser utilizados como marcadores para clasificar estos tipos celulares. En el cerdo, basándonos en la expresión de CD14 y SLA-II podemos dividir a los monocitos en tres subpoblaciones principales: CD14^{alt}SLA-II⁻, CD14⁺SLA-II⁺ y CD14⁻SLA-II⁺ (Chamorro, S et al. 2000), que corresponden a un hipotético modelo de maduración donde las células CD14^{alt}SLA-II⁻ serían las más inmaduras y las CD14⁻SLA-II⁺ representarían un estado de mayor maduración. A su vez, estas dos subpoblaciones extremas en nuestro modelo, difieren en la expresión de CD163, siendo las más inmaduras CD163⁻ y las más maduras CD163⁺. Para analizar el nivel de la expresión de los genes de los distintos receptores de quimioquinas en estas subpoblaciones de monocitos sanguíneos, se diseñaron oligonucleótidos, según lo descrito en “Material y métodos”, y se extrajo el RNA de las poblaciones CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻ y CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺, aisladas mediante separación magnética.

1.1 Separación de las poblaciones CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻ y CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺.

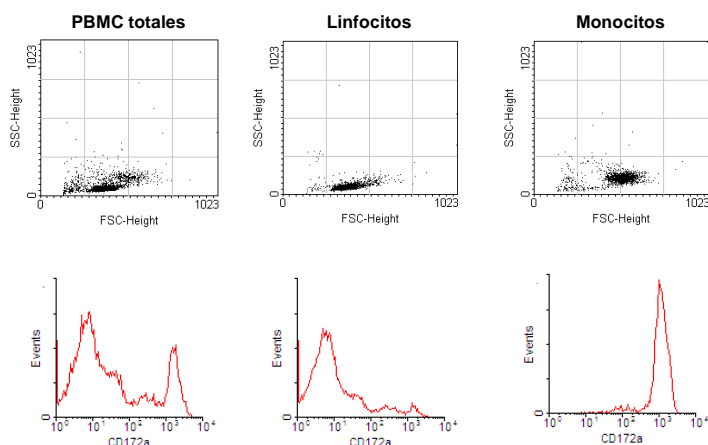


Figura 22. En la parte superior, se muestran los diagramas de puntos según los parámetros de FSC vs SSC correspondiente a PBMC totales, linfocitos y monocitos. En la parte inferior, se muestran los histogramas con los perfiles de expresión de CD172a de las tres poblaciones celulares. Experimento representativo de diez separaciones con distintos donantes.

A partir de sangre de cerdos sanos, se obtuvieron las PBMC para separar los monocitos. Estos (entre el 16 y 35%, dependiendo del animal) se obtuvieron mediante la eliminación de los linfocitos, utilizando una mezcla de anticuerpos frente a CD3, CD8 α y CD45RA. En la figura 22 se muestra un perfil representativo del FSC (asociado al tamaño) y SSC (asociado a la complejidad celular) de las PBMC, de los linfocitos y de los monocitos, estos últimos ligeramente mayores que los linfocitos. La pureza de los monocitos se comprobó por citometría de flujo mediante el marcaje con un anticuerpo anti-CD172a de las células separadas. Este anticuerpo tiñe células de la línea mielomonocítica porcina (Alvarez, B et al. 2000). En todos los casos la riqueza de los monocitos fue superior al 95% (Figura 22).

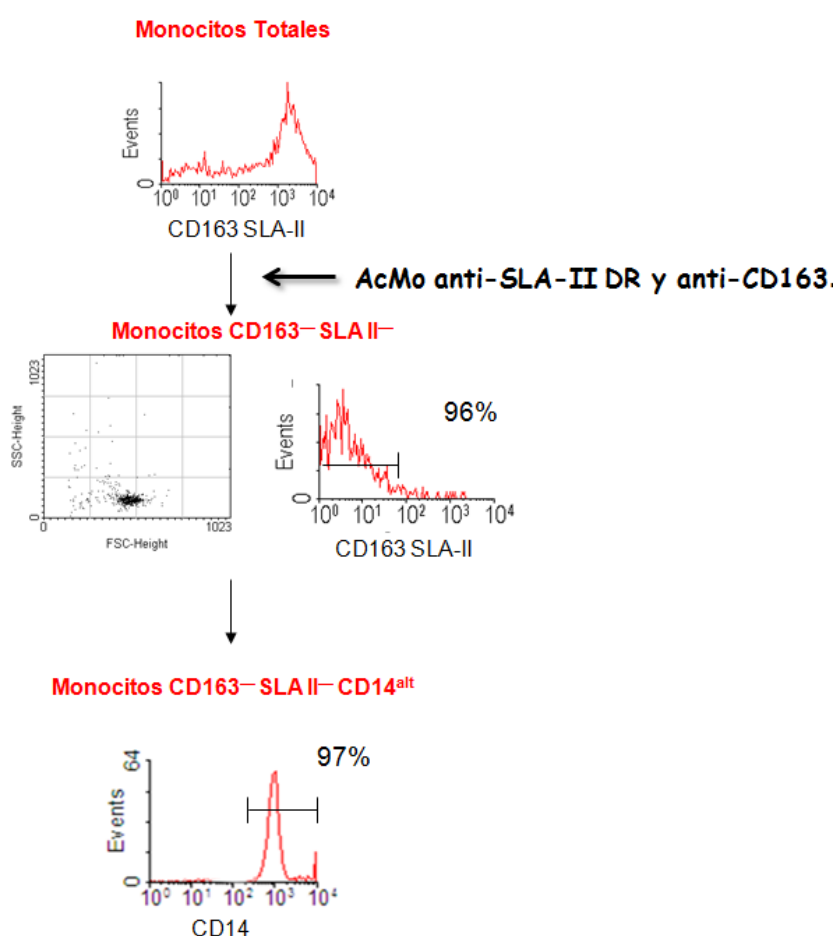


Figura 23. Aislamiento de los monocitos CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻. Diagrama de puntos mostrando los parámetros de FSC vs SSC e histogramas mostrando la expresión de los marcadores indicados en las diferentes subpoblaciones. Las células se separaron según la expresión de CD163 y SLA-II, revelando los dos anticuerpos con el mismo anticuerpo secundario. Experimento representativo de diez separaciones celulares.

A partir de los monocitos enriquecidos se realizó la separación posterior de las dos subpoblaciones: $CD14^{alt}SLA-II^{-}CD163^{-}$ y $CD14^{-}SLA-II^{+}CD163^{+}$. Los monocitos se incubaron con AcMo frente a CD163 y SLA-II para realizar una selección negativa, comprobándose que las células resultantes eran $CD163^{-}$ y $SLA-II^{-}$ y ligeramente más pequeñas. Posteriormente se constató que dichas células eran $CD14^{+}$, mediante un marcaje simple (Figura 23). Para realizar las separaciones celulares y las tinciones para el análisis por citometría se utilizó el AcMo anti-CD14 Tük-4, que es un anticuerpo generado frente al CD14 humano, que reacciona de forma cruzada con la especie porcina y que nos permite distinguir células $Tük4^{+}$ (que consideramos como $CD14^{+}$) y $Tük4^{-}$ (que consideramos como $CD14^{-}$).

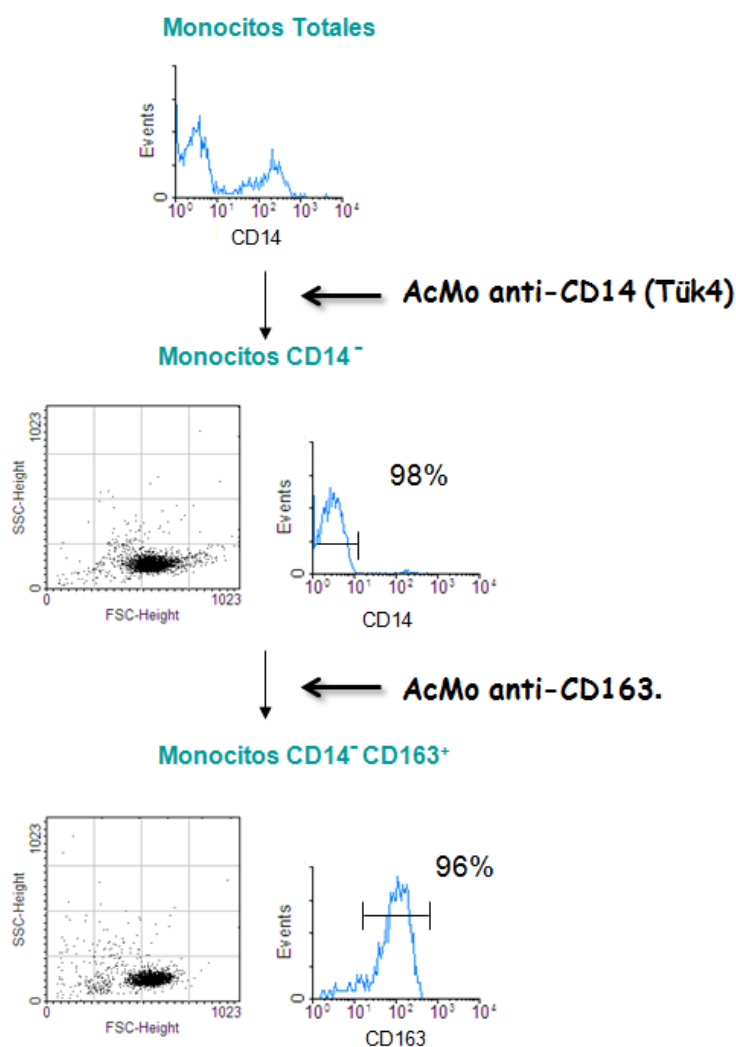


Figura 24. Aislamiento de los monocitos $CD14^{-}CD163^{+}$. Diagramas de puntos mostrando los parámetros FSC vs SSC de las diferentes subpoblaciones. Histogramas mostrando el perfil de expresión de los marcadores. Experimento representativo de al menos diez separaciones celulares.

Para el aislamiento de la población $CD14^{-}SLA-II^{+}CD163^{+}$ se realizó una eliminación de las células $CD14^{+}$ a partir de los monocitos enriquecidos. Posteriormente se realizó una selección positiva de las células $CD163^{+}$ a partir de las células $CD14^{-}$ y se comprobó por citometría de flujo que efectivamente las células eran $CD14^{-}$ y $CD163^{+}$ (Figura 24).

Después de cada separación se realizaron marcajes simples para comprobar el fenotipo celular (Figura 25). Las dos poblaciones estudiadas expresaron $CD172a$. No se observó en ninguna de las separaciones expresión intermedia de $CD14$, lo que hubiera significado contaminación con la población intermedia ($CD14^{+}SLA-II^{+}$). Todos los histogramas presentan un solo pico (unimodales) por lo que podemos considerar que las poblaciones son homogéneas.

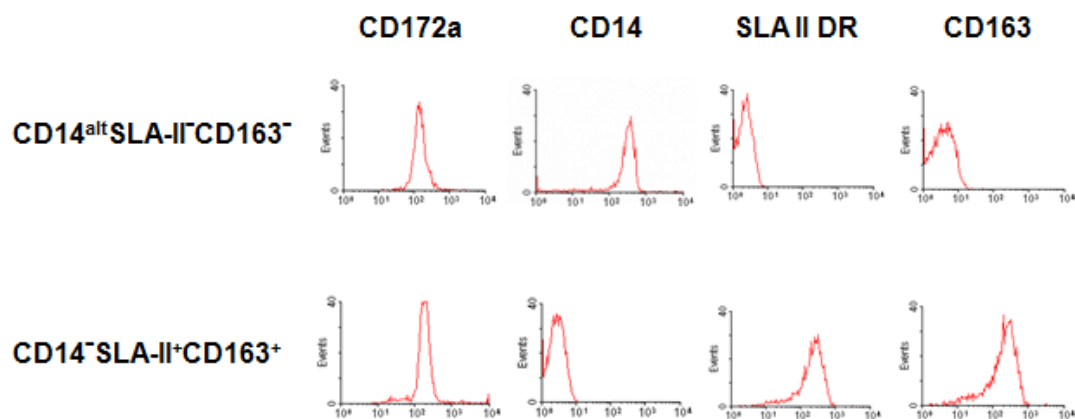


Figura 25. Histogramas representativos del fenotipo de las dos poblaciones separadas.

Las células aisladas de las dos poblaciones $CD14^{alt}SLA-II^{-}CD163^{-}$ y $CD14^{-}SLA-II^{+}CD163^{+}$ fueron fijadas y se analizaron por microscopía electrónica (figura 26). La población $CD14^{alt}SLA-II^{-}CD163^{-}$ estaba formada en su mayoría por células de forma redondeada, núcleo igualmente redondeado y central, con abundantes vesículas en el citoplasma y menor número de organelas, consistente con células de aspecto inmaduro. Algunas células presentaban un incremento del retículo endoplásmico rugoso, que estaba evidentemente dilatado y abundantes lisosomas. El 30% aproximadamente de las células mostraba un aspecto alargado con procesos típicos de células dendríticas.

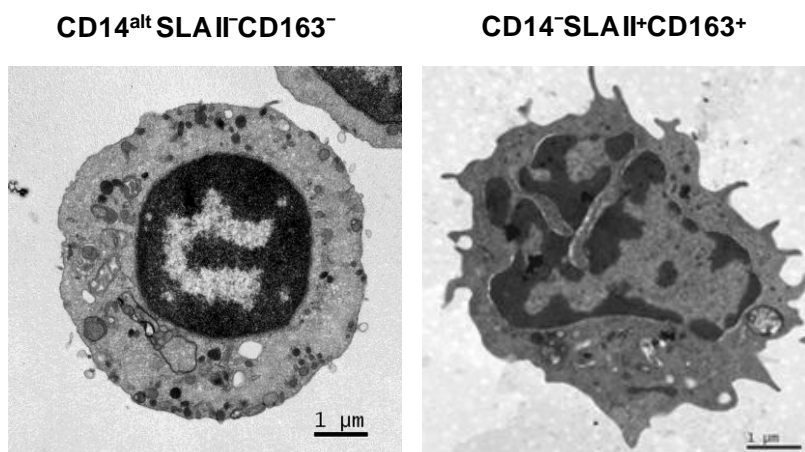


Figura 26. Microfotografías electrónicas de células representativas de las dos poblaciones separadas. Fotomicrografías obtenidas por las Dras. Carolina Rodríguez-Cariño y María Montoya, Unidad de Inmunología, Centro de investigación en sanidad animal (CRESA), Barcelona, España.

Las células que formaban la población $CD14^{-}SLA-II^{+}CD163^{+}$ eran de núcleo central lobulado o en algún caso bilobulado. En muchas de ellas se distinguían procesos típicos de células dendríticas. Los citoplasmas mostraban organelas reconocibles, destacando mitocondrias de aspecto redondeado, retículo endoplásmico y abundantes lisosomas y vesículas. En estas últimas destacaba la presencia de contenido, que podría corresponder a cierta actividad fagocítica.

1.2 Análisis por RT-PCR de los genes de receptores de quimioquinas en las poblaciones $CD14^{alt}CD163^{-}SLA-II^{-}$ y $CD14^{-}CD163^{+}SLA-II^{+}$ de monocitos.

A partir de las poblaciones separadas, se realizó la extracción de RNA total, tal como se describe en “Material y métodos”, y se realizaron PCRs utilizando cebadores específicos para los receptores de quimioquinas (tabla 7).

La expresión de CCR2, CXCR4 y CX3CR1 fue diferente en las dos poblaciones estudiadas (Figura 27). Los transcritos de CCR2 y CXCR4 fueron claramente detectados en la población $CD14^{alt}SLA-II^{-}CD163^{-}$ pero no se detectaron, o se hizo en muy bajos niveles en la población $CD14^{-}SLA-II^{+}CD163^{+}$. Por otra parte la expresión de mRNA de CX3CR1 fue negativa en las células $CD14^{alt}CD163^{-}SLA-II^{-}$ y positiva en las células $CD14^{-}CD163^{+}SLA-II^{+}$. Las dos poblaciones expresaron niveles similares de mRNA del receptor CCR5. El mRNA de CCR7 se detectó claramente en la población de monocitos totales, pero su expresión fue negativa o

muy baja en las dos poblaciones separadas. La expresión de los transcritos de CXCR1 y de CCR6 fue muy débil o indetectable, tanto en la población de monocitos totales como en las dos poblaciones separadas.

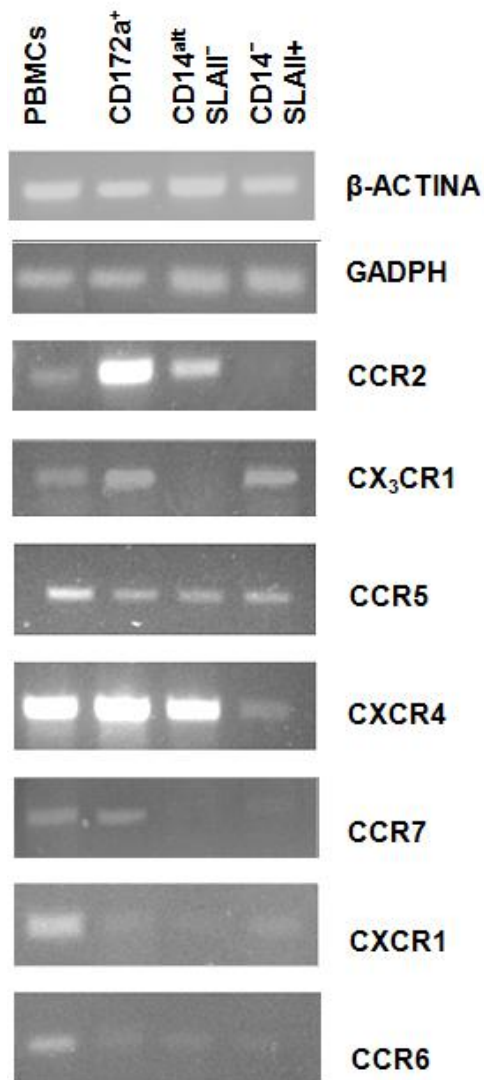


Figura 27. Expresión de los genes de los diferentes receptores de quimioquinas en PBMC, monocitos, y en las poblaciones de monocitos separadas. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1%. Como controles cualitativos y cuantitativos de RNA se utilizaron GADPH y β-actina, Experimento representativo de al menos tres realizados con diferentes donantes.

2. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE QUIMIOQUINAS PORCINAS A LAS SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS.

En un paso posterior en el estudio de las distintas subpoblaciones de monocitos porcinos desde el punto de vista de sus receptores de quimioquinas, decidimos clonar alguno de sus ligandos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por PCR, las secuencias de que podíamos disponer y la relevancia de los mismos. En concreto se abordó la clonación de CCL2, ligando de CCR2; y de CCL19 y CCL21, ambos ligandos de CCR7.

2.1 CCL2

Los resultados de RT-PCR mostraron que las dos subpoblaciones CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻ y CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺ expresaban un patrón diferente de genes de receptores de quimioquinas, siendo la primera CCR2⁺CX3CR1⁻ y la segunda CCR2⁻CX3CR1⁺. Por ello quisimos estudiar más a fondo la expresión de este receptor en las subpoblaciones de monocitos.

2.1.1 Clonación de CCL2.

La secuencia de CCL2 porcino (número acceso de GenBank: NM_214214) se clonó en dos plásmidos diferentes para poder expresar la quimioquina fusionada a GFP y a V5-HIS. Para ello se extrajo RNA de los monocitos CD172a⁺ obtenidos

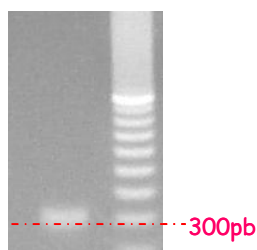


Figura 28. Purificación del fragmento de PCR de la secuencia codificante de CCL2.

por aislamiento inmunomagnético. La secuencia se amplificó con oligonucleótidos específicos que contenían uno el codón de inicio y otro el codón de terminación para obtener el fragmento que contenía la secuencia codificante completa. Dicho fragmento (328 pb) se purificó (Figura 28) y se clonó en el plásmido pcDNA3.1. A esta construcción la denominamos pCCL2-CDS.

Posteriormente la secuencia codificante de la quimioquina se subclonó en los plásmidos pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO y pcDNA3.1/V5-His-TOPO, utilizando oligonucleótidos específicos para obtener las proteínas de fusión con GFP (CCL2-GFP) y con V5-HIS (CCL2-V5-HIS) (Figura 29) y así poder detectar la quimioquina por medio de estos marcadores, ya que no

disponíamos de anticuerpos frente al CCL2 porcino. La fidelidad, orientación y la fusión con GFP y V5-HIS se comprobó mediante secuenciación.

También se obtuvieron plásmidos con la secuencia codificante de la quimioquina en orientación inversa (InvCCL2-GFP), que nos sirvieron para obtener el control negativo.

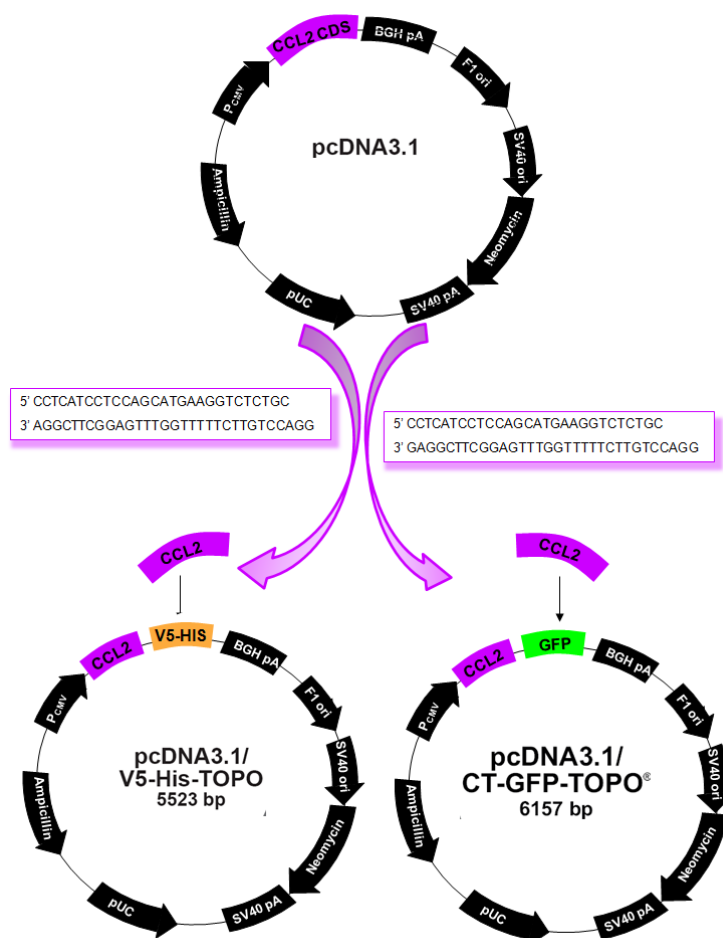


Figura 29. Subclonación de la quimioquina CCL2 en los plásmidos pcDNA3.1/V5-His-TOPO y pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO. La secuencia de CCL2 se amplificó como se explica en material y métodos.

2.1.2 Expresión de CCL2.

Una vez obtenidos los plásmidos que contenían las secuencias de las proteínas de fusión, se estableció una línea celular estable que expresaba la quimioquina CCL2 fusionada a GFP. Para ello se realizó una transfección con el plásmido pCCL2-GFP y posteriormente dos rondas de clonación por dilución límite. La expresión de la proteína de fusión se comprobó mediante citometría de flujo y por fluorescencia (figura 30).

Para observar la expresión de la quimioquina las células transfectadas se trataron con monensina. Esta droga bloquea la secreción de proteínas e induce la acumulación de las mismas en el interior celular. De esta forma es posible observar directamente la fluorescencia de la GFP, obviando la necesidad de marcar las células. Por inmunofluorescencia se observó que su expresión era citoplásmica con cierta acumulación perinuclear. Mediante *western-blot* también se comprobó la presencia de la quimioquina fusionada a GFP, tanto en un lisado celular como en el sobrenadante de cultivo (Figura 30C). Además de la banda de 38 kDa, correspondiente a la proteína de fusión CCL2-GFP se observó una banda de peso molecular de 26 kDa, que coincide con el peso de la proteína GFP. Esta banda presentó una densidad similar a la de la proteína de fusión y se detectó tanto en el lisado celular como en el sobrenadante de cultivo.

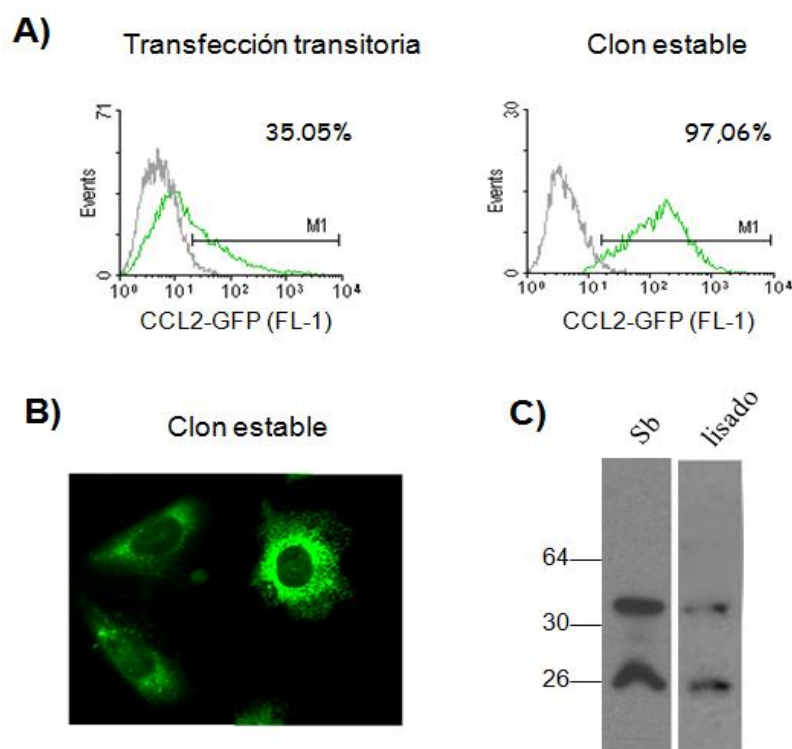


Figura 30. A) Histogramas que representan la expresión a las 24 horas de la transfección en células CHO y en el clon estable de la quimioquina fusionada a GFP (línea verde). Como control negativo se utilizaron células CHO sin transfectar (línea gris). B) Inmunofluorescencia de la línea celular CCL2-GFP. C) Western-blot de la expresión de la proteína de fusión en el sobrenadante (Sb) y en el lisado. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Revelado mediante anti-GFP-biotina y estreptavidina-HRP. Pesos moleculares: CCL2-GFP: 38kDa; GFP: 26kDa.

2.1.3 Funcionalidad y especificidad de CCL2.

Para valorar la actividad quimiotáctica de la proteína de fusión CCL2-GFP, se realizaron ensayos de quimiotaxis sobre PBMC, utilizando el sobrenadante de la línea estable. Los datos están expresados como “índice de migración”, que es el cociente entre el número de células que migran con el estímulo quimiotáctico y las células que migran frente al control (figura 31). La quimioquina mostró actividad quimiotáctica dependiente de dosis, perdiéndose el efecto con una dilución 1/50. No se observó la inhibición que a veces se produce con concentraciones altas de quimioquina.

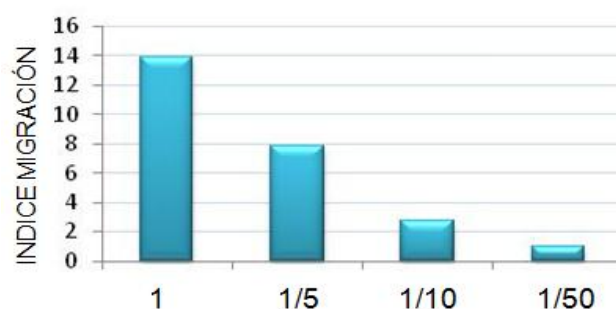


Figura 31. Ensayo de quimiotaxis en PBMC usando la quimioquina recombinante CCL2-GFP. El histograma representa el índice de migración celular. Como control negativo se utilizó sobrenadante de células CHO transfectadas con el plásmido InvCCL2-GFP. Experimento representativo de 6 realizados con diferentes donantes.

La quimioquina CCL2 se identificó en humanos como un potente agente quimiotáctico de monocitos (Deshmane, SL et al. 2009). Para estudiar el efecto de nuestra quimioquina sobre este tipo celular, se realizaron ensayos de quimiotaxis con PBMC y se analizaron las células que respondían marcándolas con un anticuerpo anti-CD172a. Consideramos monocitos a las células CD172a⁺ y linfocitos a las CD172a⁻ (Figura 32).

Como referencia se ha utilizado la quimioquina CXCL12 que es una quimioquina homeostática, cuyo receptor CXCR4 se expresa tanto en monocitos como en linfocitos. Se calculó el porcentaje de monocitos dentro de las células totales que respondieron a las quimioquinas. Del total de las células que respondieron a CCL2, más del 75% eran CD172a⁺. Mientras que el porcentaje de células CD172a⁺ y CD172a⁻ que migró en respuesta a CXCL12 fue similar (44% frente a 56%). Dado que en la población inicial de PBMC la proporción de células CD172a⁺ era del 20%, observamos un aumento de monocitos, de tres a cuatro veces,

en la población que migra hacia CCL2 respecto al control, confirmando la actividad quimiotáctica de CCL2 sobre monocitos.

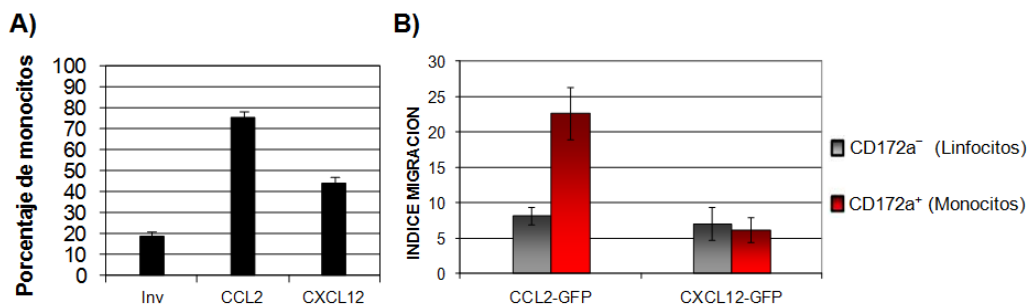


Figura 32. A) Porcentaje de monocitos en relación a las células totales que respondieron a las quimioquinas CCL2 y CXCL12. Como control negativo se utilizó sobrenadante de células CHO transfectadas con el plásmido InvCCL2-GFP. B) Respuesta de los linfocitos y monocitos a CCL2 y CXCL12. Las células que habían migrado se recogieron y se marcaron con un AcMo frente a CD172a. En el histograma se representa el índice de migración. Media de 5 experimentos realizados.

Por citometría de flujo también se comprobó que la quimioquina CCL2-GFP se une a PBMC, mayoritariamente a monocitos. No se detectó unión cuando se usó el sobrenadante de células transfectadas con el InvCCL2-GFP (Figura 33). Para demostrar la especificidad de la unión de CCL2-GFP, se realizaron una serie de experimentos de bloqueo. Los PBMC se incubaron con sobrenadante de células CHO transfectadas con CCL2-V5-HIS o con sobrenadante de células CHO sin transfectar y posteriormente con sobrenadante de CCL2-GFP. CCL2-V5-HIS bloqueó un 50% de la unión de CCL2-GFP, mientras el control InvCCL2-GFP no se unió a las células (Figura 33).

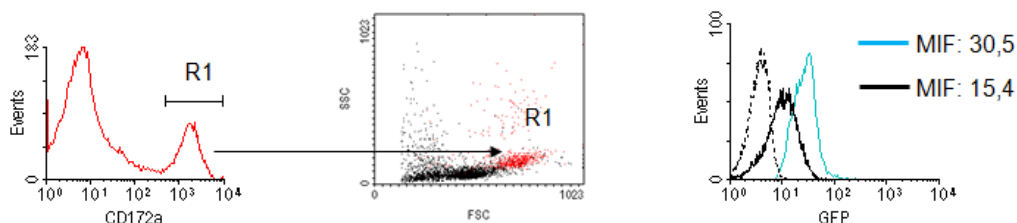


Figura 33. Bloqueo de la unión de CCL2-GFP en monocitos (R1) por CCL2-V5-HIS. 3x10⁵ PBMC fueron incubados con 50µl de sobrenadante de la construcción CCL2-V5-HIS (línea negra continua) o un sobrenadante control (línea azul) y posteriormente con 50µl de sobrenadante con CCL2-GFP. La GFP se detectó mediante anti-GFP conjugado con Alexa 488. Como control negativo se utilizó InvCCL2-GFP (línea negra punteada). Las tinciones se realizaron sobre los PBMC, delimitando la región de monocitos mediante el marcador CD172a (histograma en rojo). MIF: media de intensidad de fluorescencia.

2.1.4 Respuesta de subpoblaciones de monocitos a CCL2.

El receptor CCR2 se ha utilizado en humano y ratón para distinguir subpoblaciones de monocitos sanguíneos. Dado que la expresión del mRNA de CCR2 varió entre las subpoblaciones de monocitos estudiadas, analizamos si esa variación se correspondía con una respuesta migratoria diferente de las poblaciones de monocitos a la quimioquina. Para ello se estudió el fenotipo de los monocitos que migraban en respuesta a CCL2-GFP.

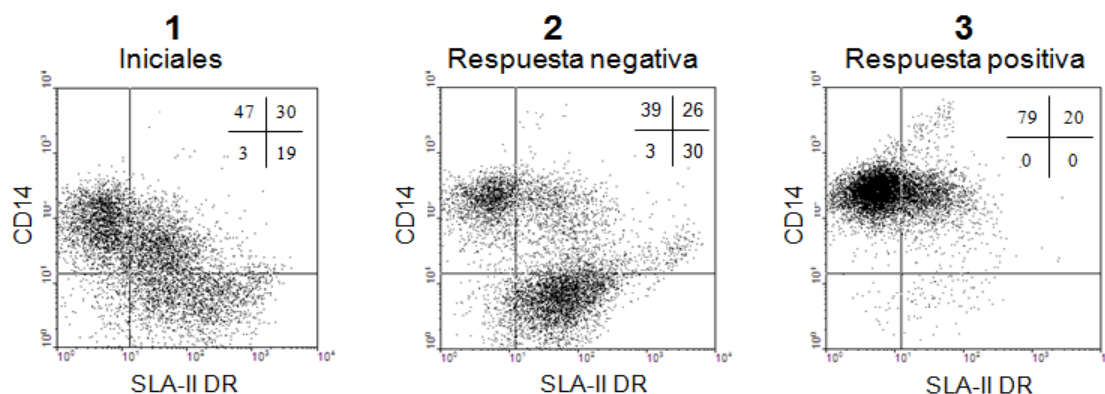


Figura 34. Respuesta de las subpoblaciones de monocitos sanguíneos a CCL2-GFP. Dobles marcajes de los monocitos con los AcMo anti-CD14 y anti-SLA-II de las células antes de la migración (1), en las células que no migraron (2) y en las células que migraron (3). Experimento representativo de 4 experimentos realizados con diferentes donantes. Las cifras en los cuadrantes corresponden a los porcentajes celulares.

Utilizando monocitos enriquecidos se realizaron experimentos de migración. Las células de los experimentos de quimiotaxis se recuperaron y se realizaron dobles marcajes con los AcMo anti-CD14 (Tük4) y anti-SLA-II. La mayoría de las células que migraron en respuesta a CCL2-GFP resultaron ser monocitos CD14^{alt}SLA-II⁻. También se detectó un porcentaje significativo de células CD14⁺SLA-II⁺, pero no se detectó respuesta de la población CD14⁻SLA-II⁺ (Figura 34).

Para descartar un cambio fenotípico de las células respondedoras por efecto del CCL2, se analizó el efecto de esta quimioquina en la expresión de los marcadores CD14 y SLA-II en monocitos cultivados en recipientes de teflón, que es un material no adherente que no altera el fenotipo celular. Tras 3 horas de incubación en estas condiciones, no se observaron diferencias en la expresión de estos marcadores entre las células tratadas con CCL2-GFP y las tratadas con sobrenadante de células transfectadas con la construcción invertida control. Además, y de manera

consistente, por tinción con IP, observamos una mejor viabilidad de las células incubadas en presencia de la quimioquina (Figura 35).

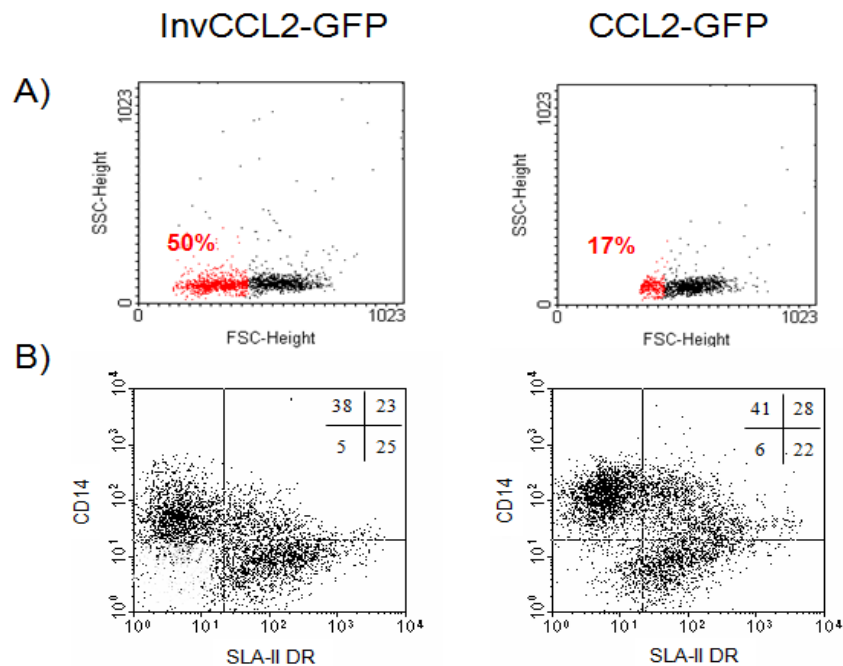


Figura 35. A) Diagramas de puntos de los parámetros FSC vs SSC de los monocitos cultivados en presencia de Inv-CCL2-GFP y CCL2-GFP. Se identificaron los monocitos no viables mediante tinción con IP (marcados en rojo) y se excluyeron del análisis posterior **B)** Efecto del CCL2 sobre la expresión de SLA-II y CD14. Los monocitos se cultivaron durante 3 horas a 37°C en recipientes de teflón en presencia de sobrenadantes de células CHO transfectadas con CCL2-GFP o con Inv-CCL2-GFP y se realizaron dobles marcajes con los AcMo anti-CD14 (Tük4) y anti-SLA-II.

Las poblaciones de monocitos estudiadas se pueden caracterizar también de acuerdo a la expresión de CD163. En concreto, la población intermedia $CD14^+SLA-II^+$ se puede subdividir en dos: $CD14^{alt}SLA-II^{ba}CD163^-$ y $CD14^{ba}SLA-II^+CD163^+$. Para caracterizar en más detalle el fenotipo de las células que responden a CCL2, se estudió en ellas la expresión de CD163, realizándose dobles marcajes con el anticuerpo anti-CD14 (Figura 36).

La mayoría de las células que migraron en respuesta a CCL2-GFP mostraban un fenotipo $CD14^{alt}CD163^-$. También se detectó respuesta de la población intermedia $CD14^+CD163^+$, mientras que la población $CD14^-CD163^+$ no migró.

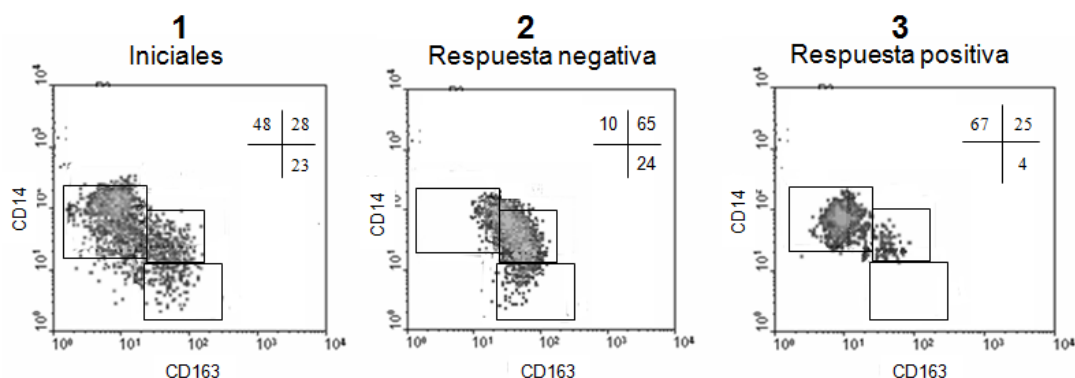


Figura 36. Respuesta de las subpoblaciones de monocitos sanguíneos a CCL2-GFP. Diagramas de densidad mostrando los marcajes con los anticuerpos anti-CD14 y anti-CD163 de las células antes de la migración **(1)**, en las células que no migraron **(2)** y en las células que migraron **(3)**. Las cifras corresponden a los porcentajes de células en las regiones representadas. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes realizados con diferentes donantes.

2.1.5 Unión de CCL2 a las subpoblaciones de monocitos.

Dado que encontramos diferentes respuestas migratorias de las poblaciones de monocitos, quisimos estudiar la unión de CCL2 a las subpoblaciones de monocitos $CD14^{alt}SLA-II^{-}$, $CD14^{+}SLA-II^{+}$ y $CD14^{-}SLA-II^{+}$. Para ello se realizaron marcajes utilizando los AcMo anti-CD172a, anti-CD14 (Tük-4) y anti-SLA-II.

De acuerdo con la expresión de CD172a y con las características de FSC/SSC, se determinó la región de monocitos donde se analizó la unión de CCL2-GFP en las diferentes subpoblaciones, definidas por la expresión de CD14 y SLA-II (Figura 37). Los monocitos $CD14^{alt}SLA-II^{-}$ y $CD14^{+}SLA-II^{+}$ mostraron una unión similar de la quimioquina CCL2-GFP. En la subpoblación de monocitos $CD14^{-}SLA-II^{+}$ no se observó unión de la quimioquina.

Los porcentajes de células de las poblaciones $CD14^{alt}SLA-II^{-}$, $CD14^{+}SLA-II^{+}$ y $CD14^{-}SLA-II^{+}$ variaron de unos experimentos a otros. Estos análisis se realizaron en cerdos de diferentes edades sin que se encontraran diferencias relacionadas con la edad del animal.

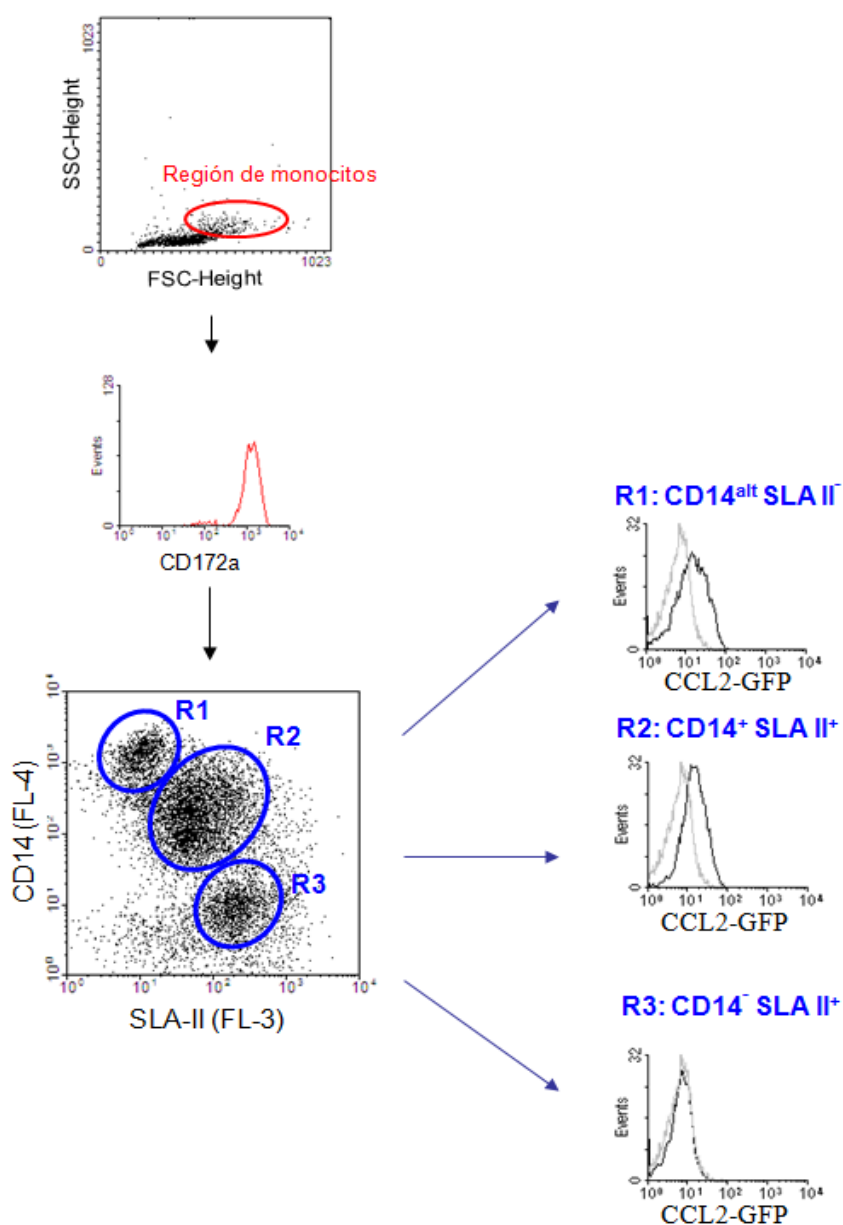


Figura 37. Unión de CCL2-GFP a las distintas subpoblaciones de monocitos porcinos. Los PBMC se incubaron con sobrenadante de la línea de expresión de CCL2-GFP y las células positivas se revelaron con un anticuerpo anti-GFP conjugado con Alexa-488. Luego se realizó un doble marcaje con anti-CD14 (Tük4) y anti-SLA-II. Los histogramas en gris representan el control negativo de fluorescencia (monocitos incubados con el sobrenadante de células CHO transfectadas con el InvCCL2-GFP). Experimento representativo de 5 experimentos realizados con donantes diferentes.

2.2 CCL19 y CCL21.

En los experimentos de expresión de receptores de quimioquinas pudimos detectar el transcrito de CCR7 en la población de monocitos totales, pero no en las dos poblaciones extremas en nuestro modelo de maduración (CD14^{alt}SLA-

II⁻CD163⁻ y CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺). Para profundizar en el estudio de los receptores de quimioquinas en las poblaciones monocíticas decidimos estudiar los ligandos del receptor CCR7, CL19 y CCL21.

2.2.1 Clonaje de CCL19 y CCL21.

El clonaje de la quimioquina porcina CCL21 en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO fue realizado en trabajos anteriores de nuestro grupo. (nº acceso Gen Bank: AJ585194)

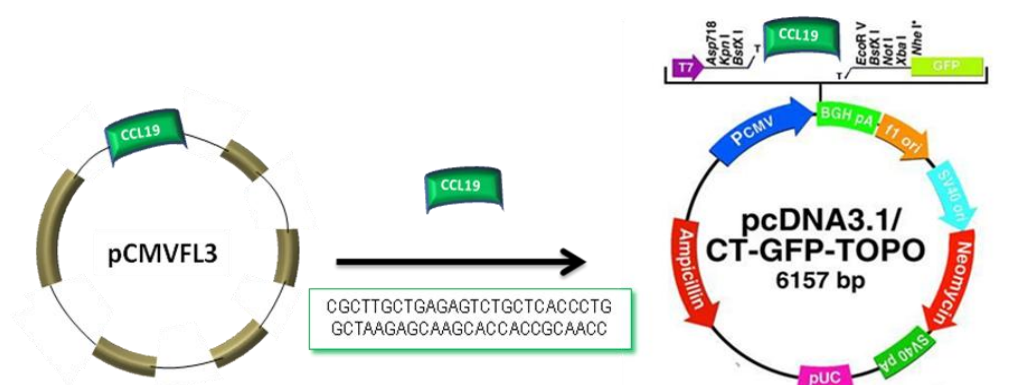


Figura 38. Esquema del clonaje de CCL19 en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO

El fragmento correspondiente a la secuencia codificante de la proteína

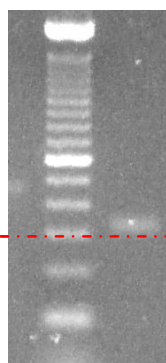


Figura 39. Purificación del fragmento de PCR de CCL19-GFP

porcina CCL19 se amplificó por PCR, utilizando como molde la secuencia cedida por el Dr. Uenishi en el plásmido pCMVFL3, mediante unos oligonucleótidos específicos que nos permitieron subclonar la secuencia en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO de tal forma que estuviera en fase con la secuencia que codifica la GFP, incluida en este plásmido. El fragmento amplificado (329 pb), una vez purificado (Figura 39), se insertó en el plásmido indicado. A esta construcción la denominamos pCCL19-GFP (Figura 38). La orientación

y fidelidad de la secuencia, así como la fusión con la secuencia que codifica la GFP se comprobó mediante secuenciación.

2.2.2 Expresión de CCL19 y CCL21.

Utilizando los plásmidos mencionados se transfectaron células CHO y se establecieron líneas celulares que expresaban las quimioquinas porcinas CCL19 y CCL21 fusionadas a GFP. La expresión de las correspondientes proteínas de fusión se comprobó mediante citometría de flujo y por inmunofluorescencia, mostrando ambas localización citoplásmica (Figura 40).

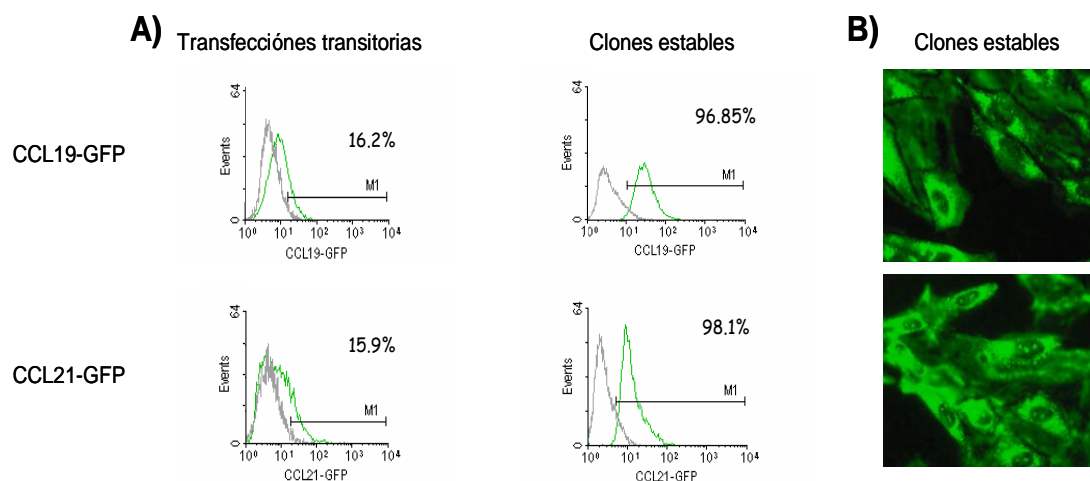


Figura 40. **A)** Histogramas que representan la expresión a las 24 horas de la transfección y en los clones que expresan de forma estable las respectivas quimioquinas fusionadas a GFP (línea verde). Las células se trataron previamente con monensina. Como control negativo se utilizaron células CHO sin transfectar (línea gris). **B)** Análisis mediante inmunofluorescencia de las líneas de CCL19-GFP y CCL21-GFP. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 50% de confluencia en el cultivo celular, se trataron con monensina y se analizó la expresión por fluorescencia.

La expresión de las moléculas de fusión de estas quimioquinas con GFP se comprobó también mediante western-blot, tanto en lisados celulares como en los sobrenadantes de cultivo (Figura 41).

Al contrario de lo ocurrido con la preparación de CCL2-GFP, cuando se reveló con un anticuerpo anti-GFP el western-blot de los sobrenadantes y de los lisados de las líneas de expresión de CCL19-GFP y CCL21-GFP, en los sobrenadantes no apareció la banda de 26kDa, correspondiente el peso de la proteína GFP o lo hizo en una proporción mucho menor que la proteína de fusión.

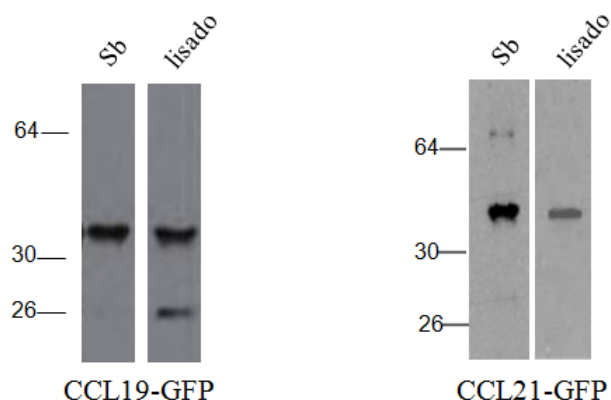


Figura 41. Western-blot de los sobrenadantes de las líneas estables que expresan las quimioquinas CCL19 y CCL21, fusionadas a GFP. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12% en condiciones reductoras. Se reveló con un anticuerpo anti-GFP marcado con biotina y posteriormente con estreptavidina-HRP. CCL19-GFP: 39.5kDa; CCL21-GFP: 42KDa; GFP: 26KDa

2.2.3 Funcionalidad

Para valorar la actividad quimiotáctica de las quimioquinas CCL19 y CCL21, se utilizaron sobrenadantes de las líneas generadas y se realizaron ensayos de quimiotaxis sobre PBMC. Una vez comprobado que las dos proteínas de fusión eran quimiotácticas, se comparó la actividad de las dos sobre PBMC. Para ello, primero se realizó un dot-plot con distintas diluciones de los sobrenadantes para normalizar la cantidad de las quimioquinas, eligiéndose la dilución que mostraba una intensidad similar de la señal en el *dot-plot* (Figura 42).

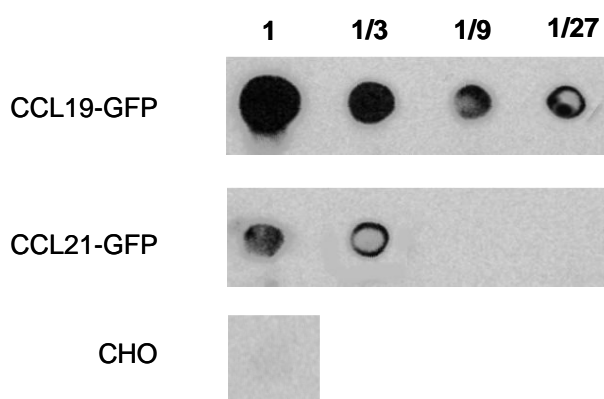


Figura 42. Dot-plot de distintas diluciones de los sobrenadantes de las líneas de CCL19-GFP y de CCL21-GFP. La membrana se reveló mediante un anticuerpo policlonal anti-GFP-biotina y estreptavidina-HRP.

Como se observa en la figura 42, la intensidad de la señal de CCL21-GFP sin diluir es aproximadamente equivalente a la dilución 1/9 de CCL19-GFP, por

tanto, para los ensayos de migración se utilizó esta dilución de CCL19-GFP y el sobrenadante sin diluir de CCL21-GFP. También se estudio el efecto quimiotáctico de los sobrenadantes sobre linfocitos y monocitos. Para ello se realizaron marcajes de las células respondedoras, con el anticuerpo anti-CD172a, tal como se ha explicado anteriormente (Figura 43). CCL19 indujo la migración de más células, alcanzando un índice medio de migración de 11 frente a 4 con CCL21 (Figura 43A). No se observaron diferencias significativas en cuanto a la respuesta de las poblaciones de monocitos y linfocitos por separado en ninguno de los casos (Figura 43B).

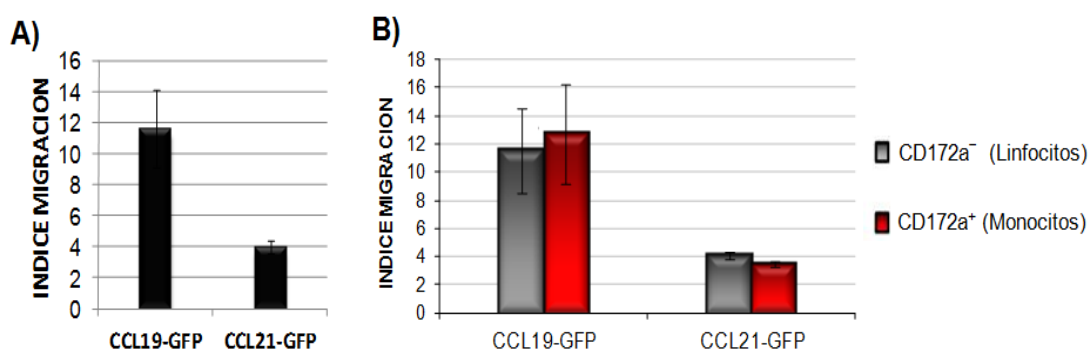


Figura 43. Ensayo de quimiotaxis en PBMC usando las quimioquinas CCL19-GFP y CCL21-GFP. Los histogramas representan el índice de migración. Como control negativo se utilizó sobrenadante de células CHO. **A)** Migración de PBMC totales. **B)** Respuesta de linfocitos y monocitos. Media de 3 experimentos realizados con diferentes donantes.

2.2.4 Respuesta de subpoblaciones de monocitos a CCL19 y CCL21

Para estudiar la subpoblación de monocitos que respondía a los ligandos de CCR7, se realizaron experimentos de quimiotaxis utilizando monocitos enriquecidos. A partir de las células recuperadas de los ensayos, se realizaron dobles marcajes con AcMo anti-CD14 y anti-SLA-II. La mayoría de las células que migraron en respuesta a CCL19-GFP y CCL21-GFP presentaban un fenotipo CD14⁺SLA-II⁺, correspondiente a la población *intermedia*. No se detectó migración en la misma medida de las dos poblaciones extremas CD14^{alt}SLA-II⁻ y CD14⁻SLA-II⁺ (Figura 44). Tampoco se detectó en ningún caso migración en respuesta al control negativo, el sobrenadante de células CHO sin transfectar. Los porcentajes de células CD14⁺SLA-II⁺, dentro del total de células respondedoras a las dos quimioquinas fueron similares, aunque el índice de migración de CCL19 fue superior al de CCL21.

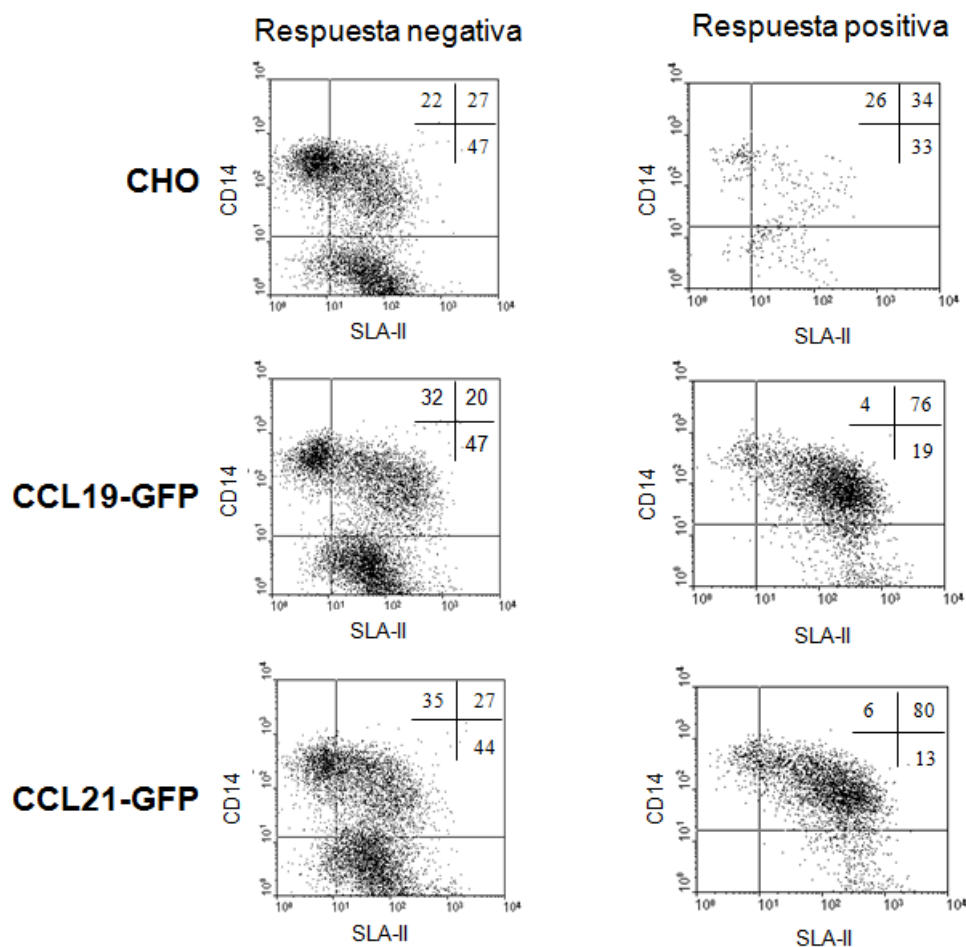


Figura 44: Análisis fenotípico de los monocitos que responden a CCL21-GFP y a CCL19-GFP. Diagramas de puntos mostrando los marcajes con anticuerpos anti-CD14 y anti-SLA-II de las células que no migraron (respuesta negativa) y de las células que migraron (respuesta positiva). Como control se utilizó sobrenadante de células CHO sin transfectar. Experimento representativo de 3 experimentos realizados con diferentes donantes. Los números indican los porcentajes de células en cada cuadrante

2.2.5 Unión de las proteínas recombinantes CCL19-GFP y CCL21-GFP a PBMC.

Como ya hemos observado con CCL2-GFP, las quimioquinas se pueden unir a sus receptores en las células con afinidad suficiente para poder ser detectadas mediante citometría de flujo. Basándonos en este supuesto nos planteamos utilizar los sobrenadantes de las líneas de expresión de CCL19-GFP y CCL21-GFP a modo de ligando sobre células sanguíneas. Sin embargo, en las condiciones utilizadas no se detectó unión de estas quimioquinas a las células sanguíneas. Como control positivo de la unión se utilizó CCL2-GFP (Figura 45).

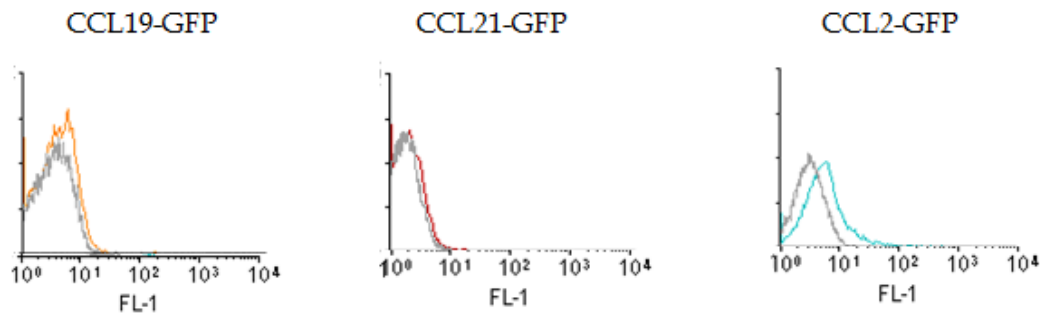


Figura 45. Unión de CCL19 y CCL21 a PBMC. Histograma en gris: sobrenadante de células CHO sin transfectar. Histogramas coloreados: de las distintas quimioquinas-GFP.

La presencia de ligandos para el receptor CCR7 en la sangre del animal donante, puede dar lugar a la ocupación del receptor, impidiendo la unión de nueva quimioquina. Para descartar esta posibilidad, las PBMC fueron incubadas en medio fresco durante 1 hora a 37°C, antes de añadir las quimioquinas recombinantes, obteniéndose idéntico resultado.

2.2.6 Clonación de CCL19-Fc.

Con la proteína de fusión CCL19-GFP fuimos capaces de ver migración celular pero no unión a su receptor. Consideramos que esto podría deberse a la baja concentración de las quimioquinas en el sobrenadante de cultivo. Por ello se construyó una nueva proteína recombinante con la quimioquina CCL19 fusionada a la porción Fc de IgG1 humana, con objeto de purificarla y concentrarla. Elegimos CCL19 entre los dos ligandos de CCR7 porque mostró un mejor comportamiento en los ensayos de migración con linfocitos y monocitos que la quimioquina CCL21. Además se ha descrito que esta quimioquina presenta más afinidad por CCR7 y que es capaz de actuar a concentraciones más bajas (Britschgi, MR et al. 2008; Yoshida, R et al. 1998b). La fusión con Fc humano posibilita la purificación de la proteína de fusión mediante técnicas clásicas, como las columnas de afinidad de proteína A o G, o por métodos más específicos para inmunoglobulinas humanas, que están en constante desarrollo. La fusión con Fc presenta otras ventajas como el incremento de la viabilidad y vida media de la proteína e incluso de su producción en células de mamífero (Ferrone, CR et al. 2006; Lo, KM et al. 1998), además de favorecer la formación de dímeros, (a través del Fc) que es un factor importante para la unión de la quimioquina con su receptor (Mellado, M et al. 2001).

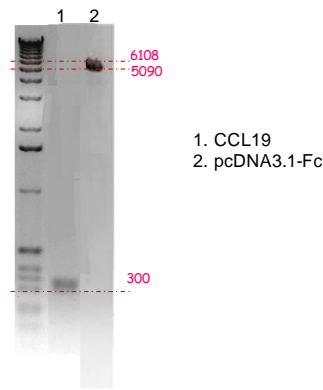


Figura 46: Fragmentos digeridos y purificados de las secuencias del plásmido pcDNA3.1-Fc y de CCL19 (326 pb).

La secuencia de la quimioquina CCL19 se amplificó con los oligonucleótidos específicos que contenían dianas de restricción para la enzima XbaI, utilizando como molde la construcción cedida por el Dr. Uenishi (en el plásmido pCMVFL3). Se obtuvo un fragmento de 326 pb, que una vez purificado y digerido se introdujo en el plásmido pcDNA3.1-Fc mediante digestión y ligación. El análisis electroforético de los fragmentos digeridos y purificados se muestra en la figura 46.

La fidelidad, orientación, así como la fusión con la porción Fc de la IgG1 humana, se comprobó por secuenciación. La construcción resultante se denominó pCCL19-Fc (Figura 47).

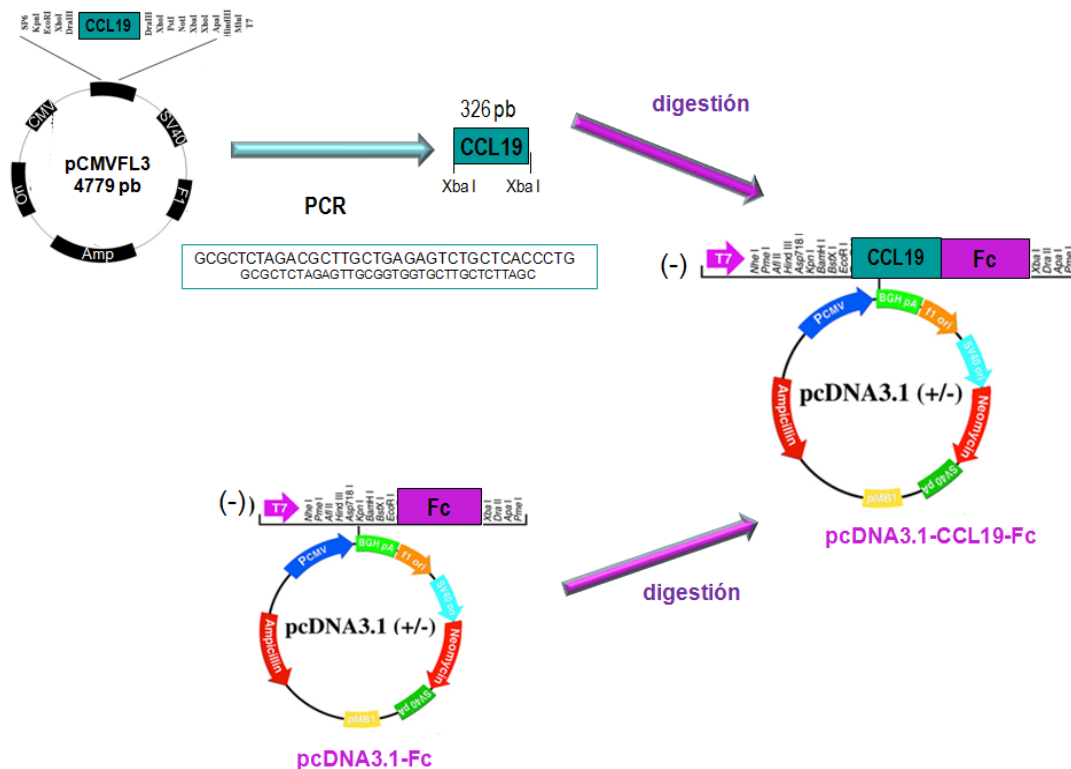


Figura 47. Esquema del clonaje de la quimioquina CCL19 porcina en fase con la porción Fc de IgG1 humana en el plásmido pcDNA3.1.

2.2.7 Expresión y funcionalidad de CCL19-Fc.

Una vez obtenido el plásmido pcDNA3.1 CCL19-Fc se generó una línea que expresa la proteína de fusión. También se generó una línea de expresión con el plásmido pcDNA3.1 hCCL1-Fc, cedido por la Dra. Leonor Kremer (CNB-CSIC, España), para utilizar la proteína humana CCL1-Fc como control negativo en algunos de los experimentos de migración.

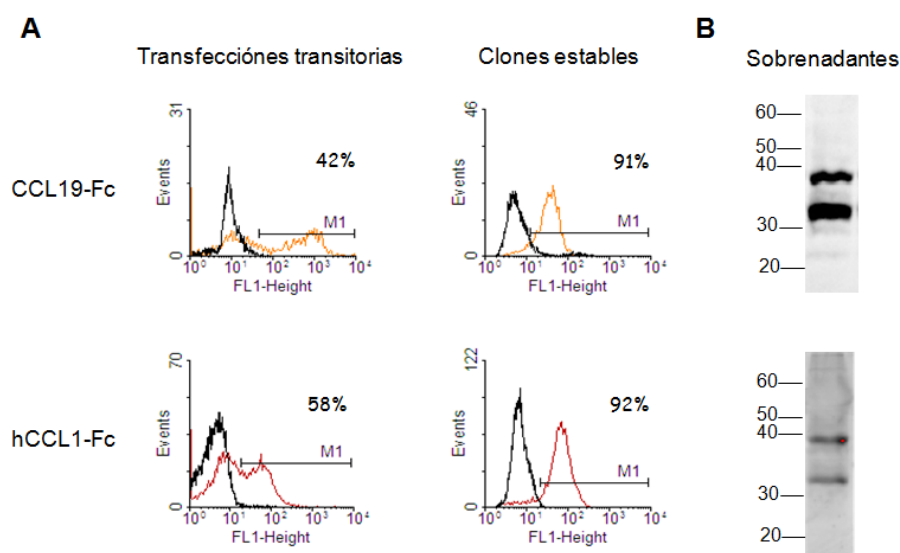


Figura 48. A) Expresión de las quimioquinas CCL19 porcina y CCL1 humana fusionadas a Fc. Los histogramas representan la expresión a las 24 horas de la transfección y de las líneas estables de las quimioquinas fusionadas a Fc. Como control negativo se utilizaron células CHO sin transfectar. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 50% de confluencia en el cultivo celular y se trataron con monensina. La expresión de la proteína de fusión se determinó con un anticuerpo anti-hIgG-FITC que se une a la porción Fc **B)** Western-blot de la expresión de las proteínas de fusión. El revelado se realizó mediante un anticuerpo anti-hIgG-biotina y estreptavidina-HRP. CCL19-Fc: 34,5 kDa.

La expresión de las respectivas proteínas de fusión se comprobó mediante citometría de flujo (Figura 48A) y western-blot usando anticuerpos específicos frente a la porción Fc de IgGs humanas (figura 48B). El análisis en SDS-PAGE de la proteína muestra dos bandas mayoritarias entre 30 y 40 kDa. La menor coincide con el peso molecular teórico de la cadena polipeptídica de CCL19-Fc (34,5 kDa) y hCCL1-Fc (34,1 kDa). Para descartar que la aparición de dos bandas fuera consecuencia de la degradación de la proteína se recogieron sobrenadantes a distintos días de cultivo y se comprobó la cinética de acumulación de proteína en el sobrenadante (Figura 49). Ninguna de las dos bandas, ni en el sobrenadante de CCL19-Fc ni en el sobrenadante de hCCL1-Fc se acumuló más que la otra con el

tiempo de cultivo, sugiriendo que las dos proteínas son producidas por las células por igual.

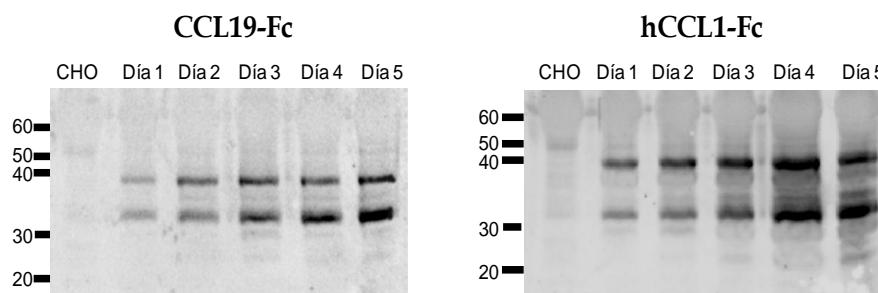


Figura 49. Western-blot de los sobrenadantes de las líneas de expresión de CCL19-Fc y hCCL1-Fc. Las células se cultivaron durante 5 días, recogiendo el sobrenadante cada día. El revelado se realizó mediante un anticuerpo anti-IgG-Biotina y estreptavidina-HRP. Pesos moleculares: CCL19-Fc: 34,5 kDa. CCL1-Fc: 34,1 kDa.

El análisis de la estructura primaria de las proteínas muestra dos posibles sitios de N-glicosilación en la proteína hCCL1-Fc y uno en la proteína CCL19-Fc, según predicción informática (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. R.Gupta, E. Jung and S. Brunak). Considerando que cada sitio de N-glicosilación puede añadir unos 2,5 kDa de media al peso de la proteína (Kornfeld, R et al. 1985), el peso teórico de la proteína CCL19-Fc glicosilada sería de 37 kDa y el de hCCL1-Fc glicosilado de 39,1 kDa, que coincide con el tamaño de las bandas superiores que observamos en los *western-blot*.

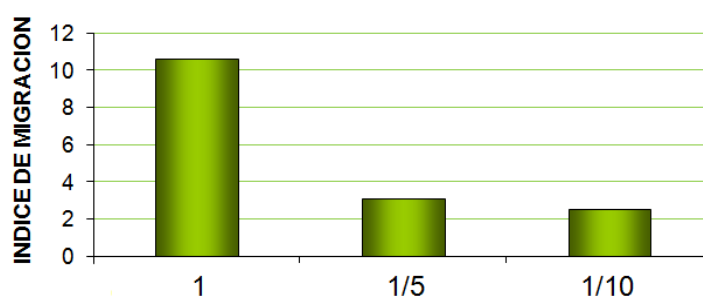


Figura 50: Funcionalidad de la quimioquina sobre PBMC. El histograma representa el índice de migración obtenido con el sobrenadante de la línea CCL19-Fc. Como control negativo se utilizó sobrenadante de células CHO sin transfectar.

Para comprobar que la quimioquina fusionada con el Fc mantiene la capacidad quimiotáctica de la quimioquina CCL19, se realizaron experimentos de migración de PBMC con sobrenadantes de la línea estable. Como control negativo

utilizamos sobrenadante de células CHO sin transfectar. El índice de migración del sobrenadante cayó rápidamente con la dilución lo que sugería una baja concentración de proteína (Figura 50).

Para facilitar los experimentos de migración y de unión al receptor del CCL19, se generó una línea que expresaba su receptor, CCR7. El plásmido (pCMVFL3) que contenía la secuencia de CCR7 porcino (número acceso de GenBank: AB090872) fue cedido por el Dr. Hirohide Uenishi (Shinkai, H et al. 2003). Este cDNA se subclonó en el plásmido pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, de forma que se expresara como proteína de fusión, con la GFP en el extremo C-terminal del CCR7. A esta construcción la denominamos pCCR7-GFP. La expresión de la línea estable CHO-CCR7-GFP se comprobó mediante citometría de flujo (Figura 51), y la distribución en la membrana celular fue confirmada mediante fluorescencia en un microscopio confocal, mediante marcaje con faloidina, que es una proteína capaz de unirse a microfilamentos de F-actina del citoesqueleto celular, como los que se encuentran por debajo de la membrana celular.

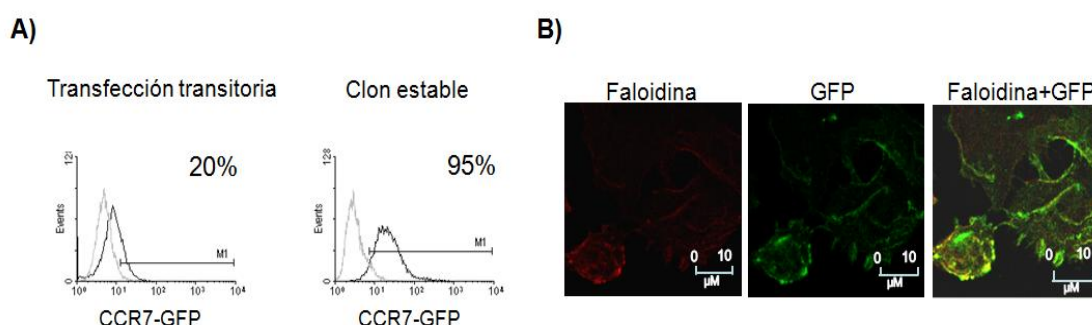


Figura 51. A) Histograma que representa la expresión a las 24 horas de la transfección y de la línea estable del receptor CCR7-GFP (línea negra). Como control negativo se utilizaron células CHO sin transfectar (línea gris). **B)** Fluorescencia en la línea CCR7-GFP. Las células se cultivaron hasta alcanzar el 50% de confluencia y se tiñeron con faloidina-TexasRed. Se comprobó la expresión en membrana del receptor CCR7 mediante un microscopio confocal.

Para confirmar que CCL19 y CCL21 actúan específicamente a través de CCR7, hemos realizado ensayos de quimiotaxis sobre las células CHO-CCR7-GFP, utilizando como control negativo las células CHO sin transfectar. Las células CHO-CCR7-GFP migraron en respuesta a los sobrenadantes de las líneas CCL19-GFP, CCL21-GFP y CCL19-Fc, pero no al sobrenadante de hCCL1-Fc ni al de las células CHO sin transfectar. Las células CHO control no respondieron en ningún caso. Este resultado demuestra que las quimioquinas producidas CCL19 y CCL21 actúan a

través del receptor CCR7. Al igual que habíamos observado en los ensayos de migración con PBMC, CCL19 indujo de forma más eficiente que CCL21 la migración de las células CHO-CCR7-GFP (Figura 52).

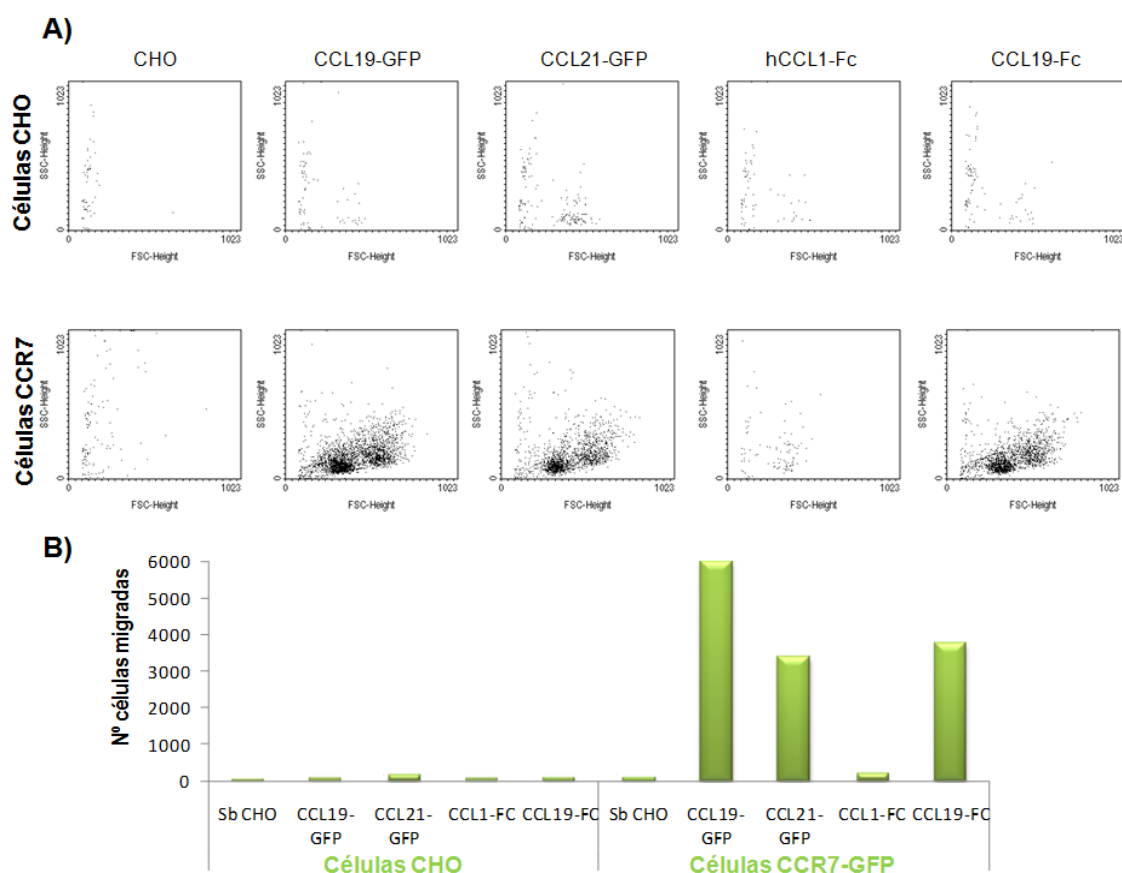


Figura 52. Ensayo de quimiotaxis en respuesta a los sobrenadantes de CCL19-GFP, CCL21-GFP y de CCL19-Fc. **A)** Representaciones de FSC vs SSC de las células (CHO y CCR7-GFP) que respondieron hacia los estímulos indicados. **B)** El histograma representa el número de células que migraron a los estímulos. Como controles se utilizaron el sobrenadante de células CHO sin transfectar y el sobrenadante de la línea estable de expresión hCCL1-Fc. Experimento representativo de 3 realizados.

2.2.8 Purificación de CCL19-Fc

2.2.8.1 Columnas de proteína A.

La rápida pérdida de actividad quimiotáctica que se produjo al diluir el sobrenadante de la línea de expresión del CCL19-Fc nos indujo a purificar la quimioquina con la finalidad de obtenerla más concentrada. En principio se utilizaron columnas de proteína A, a la que se une la porción Fc de nuestra construcción. Para evitar la copurificación de inmunoglobulinas bovinas presentes en el SFB utilizado en el medio de cultivo, estas se eliminaron pasando el SFB por

otra columna de proteína A de forma previa al cultivo. De esta forma la columna de proteína A sólo fijaría la proteína de fusión CCL19-Fc. La concentración de proteína presente en las fracciones de elución se determinó por densidad óptica medida a 280nm, comprobándose posteriormente su pureza mediante electroforesis en geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie. Los geles así revelados mostraron dos bandas entre 30 y 40 kDa, de forma similar a lo obtenido por Western-Blot. En un análisis densitométrico estas bandas representaron más del 85% de la proteína presente en el carril. (Figura 53).

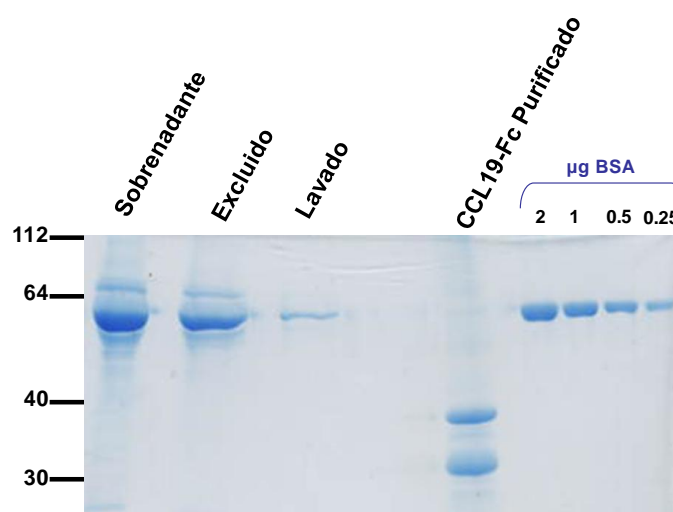


Figura 53. Tinción con Azul de Coomassie de un gel acrilamida/bisacrilamida donde se muestra el CCL19-Fc antes de purificar (sobrenadante) y purificado. A la derecha se muestra una curva patrón con distintas concentraciones de BSA.

Para la cuantificación de la proteína de fusión se puso a punto un ensayo ELISA, utilizando como anticuerpo de captura un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humana, y para la detección un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana marcado con biotina. Se estableció una curva patrón utilizando IgG1 humana purificada. Con este ELISA, capaz de detectar hasta 0,5 ng/ml de IgG, se cuantificó la cantidad de CCL19-Fc presente en los sobrenadantes de partida, en la fracción excluida de la columna y en las diferentes fracciones de elución.

El proceso de purificación se realizó hasta en 4 ocasiones, obteniéndose diferentes rendimientos. En general, a partir de los sobrenadantes de la línea de expresión con concentraciones de alrededor de 2 µg/ml, se obtuvo la proteína purificada, repartida en varias fracciones que mostraron concentraciones de hasta 960 µg/ml (Figura 54). En todas las ocasiones, prácticamente toda la quimioquina

recombinante fue capturada por la columna, detectándose solo trazas de CCL19-Fc en las fracciones excluidas. El rendimiento de la columna (o recuperación de proteína total) se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Recuperación de la proteína total} = \frac{\text{Concentración}_{\text{final}} \times \text{Volumen}_{\text{final}}}{\text{Concentración}_{\text{inicial}} \times \text{Volumen}_{\text{inicial}}}$$

La recuperación total de quimioquina-Fc fue próxima al 80%. Para los experimentos funcionales y de unión a células se utilizaron las fracciones con mayor concentración. La quimioquina control hCCL1-Fc se purificó en un proceso similar para ser utilizada como control negativo.

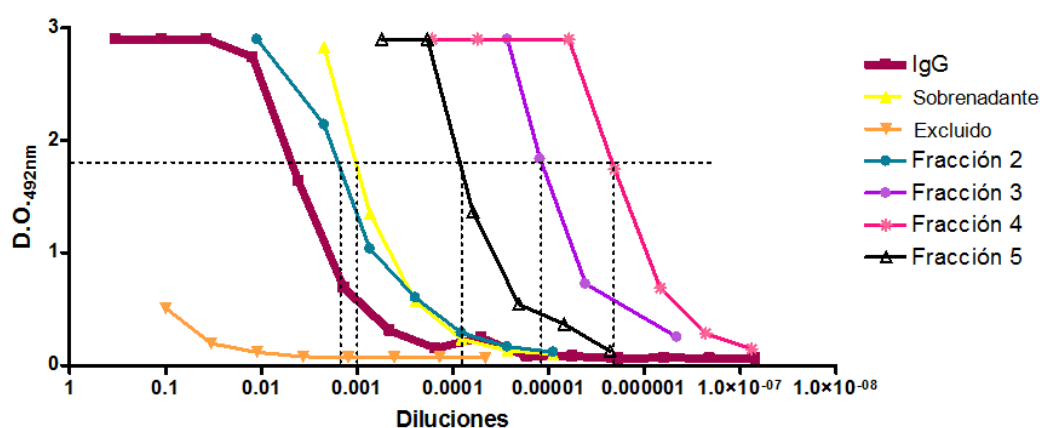


Figura 54. Determinación mediante ELISA de la concentración de CCL19-Fc en las diferentes fracciones de purificación. Curvas en función de la densidad óptica y las diluciones, de las distintas fracciones (2-5) recogidas durante la elución de la proteína. La línea más gruesa corresponde a la curva patrón de IgG humana purificada con una concentración inicial de 1µg/ml. Experimento representativo de 4 realizados.

Para evaluar la actividad quimiotáctica se realizaron ensayos de migración, comparando la actividad del sobrenadante con la de la quimioquina purificada, tanto sobre PBMC como sobre las células CHO-CCR7-GFP (Figura 55). De esta forma podemos calcular el porcentaje de recuperación de la actividad en el proceso de purificación. El CCL19-Fc purificado mostró actividad quimiotáctica sobre ambos tipos celulares. Las células de la línea CHO-CCR7-GFP respondieron mejor a CCL19-Fc que los PBMC. Por su parte, la quimioquina control hCCL1-Fc, mostró cierta actividad quimiotáctica sobre PBMC, pero no sobre células CHO-CCR7-GFP.

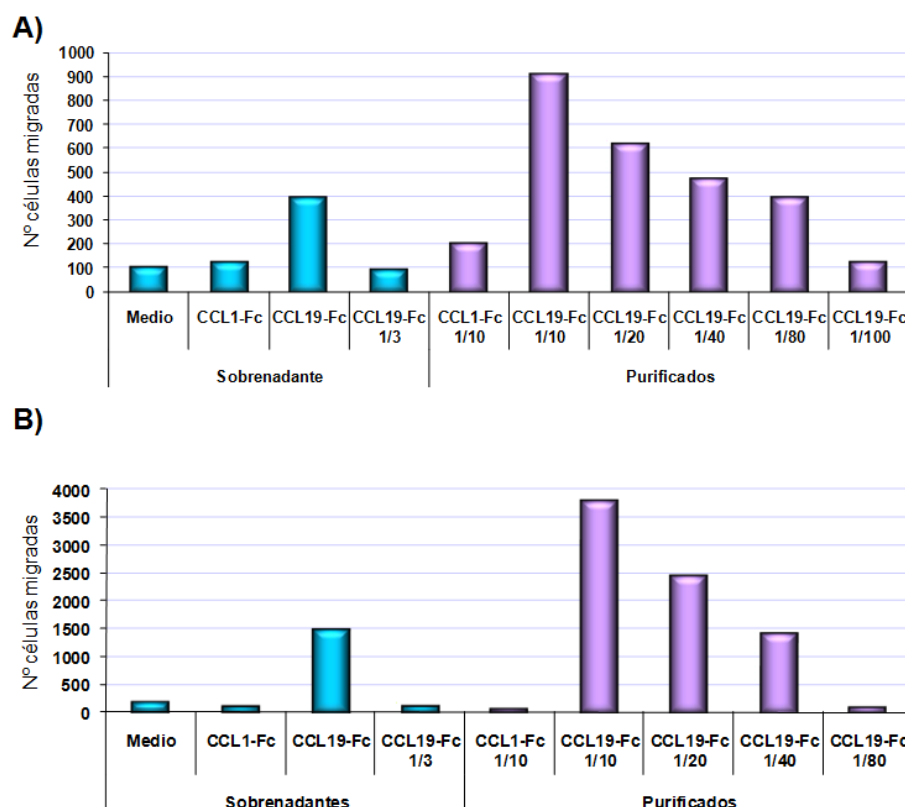


Figura 55. Migración de PBMC (A) y de células CCR7-GFP (B) en respuesta a CCL19-Fc y CCL1-Fc presentes en los sobrenadantes de cultivo sin purificar (barras azules) y purificados (barras moradas). Experimento representativo de al menos 3 realizados. La concentración de la proteína en el sobrenadante es de 2 µg/ml, la de la proteína purificada es de 900 µg/ml.

La actividad tanto del sobrenadante como de la proteína purificada se calculó mediante los ensayos de migración, considerando como valor de actividad (expresado en unidades) el inverso de la mayor dilución a la que todavía se observa migración. El sobrenadante, con una concentración final de quimioquina de 2 µg/ml, presentó actividad quimiotáctica, perdiendo dicha actividad al diluirse. Por su parte, de la proteína purificada para obtener respuesta quimiotáctica se necesitaron concentraciones finales en el ensayo de 20 µg/ml, aproximadamente. Con el dato de “unidades de actividad” se calculó la actividad inicial en el sobrenadante y en la fracción purificada según la fórmula:

Actividad: Unidades de actividad x volumen

Tomando la actividad inicial como el 100%, se calculó el porcentaje de actividad recuperada en la purificación. También se calculó la actividad específica según la fórmula:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Unidades de actividad}}{\mu\text{g proteína}}$$

Estos resultados nos muestran una pérdida de la actividad de la proteína purificada con respecto al sobrenadante. En la tabla 9 se muestra un ejemplo de los valores obtenidos de proteína en el sobrenadante inicial y la fracción purificada, pureza de la proteína purificada, actividad (inicial y final) y recuperación de la actividad quimiotáctica y la actividad específica.

	Volumen (ml)	μg /ml	Unidades de Actividad (U/ml)	Actividad inicial	% Actividad recuperada	Actividad específica	% Pureza
SOBRENADANTE	350	2,17	2	700	—	0.92	—
PURIFICADO (Fracción 4)	0,5	960	160	80	11.4	0.16	85

Tabla 9. Evaluación de la purificación de proteína recombinante mediante columnas de proteína A. Análisis de la fracción de 0,5ml más concentrada (fracción 4) eluida de la columna. La concentración de la proteína específica (μg/ml) fue determinada mediante ELISA. Ejemplo representativo de 3 purificaciones.

Aunque en el proceso de purificación, la proteína fue concentrada entre 200 y 450 veces, la actividad recuperada, determinada en ensayos de migración con PBMC y células CHO-CCR7-GFP, fue como máximo del 25%.

2.2.8.2 Identificación de las células a las que se une el CCL19-Fc

Tras su purificación en columnas de proteína A, se utilizó la quimioquina recombinante CCL19-Fc como ligando con la idea de reconocer a las células CCR7 positivas. En principio lo hicimos sobre la línea estable de expresión CCR7-GFP, obteniendo una tinción claramente positiva en comparación con las células CHO sin transfectar (Figura 56B). Cuando se utilizó el control negativo, la quimioquina hCCL1-Fc, el resultado fue negativo, lo que nos indica que la unión de la quimioquina a su ligando es específica (Figura 56C). Aunque la quimioquina se unía a todas las células, la intensidad del marcaje fue baja comparada con la expresión del receptor (Figura 56A). Esto podría deberse a una baja concentración de quimioquina activa que no permite ocupar todos los receptores. En ningún caso se obtuvo un resultado positivo cuando se utilizaron PBMC (Figura 56D), lo que puede ser debido a que estas células presentan un número menor de receptores

para esta quimioquina en su superficie, en comparación con la línea CHO-CCR7-GFP.

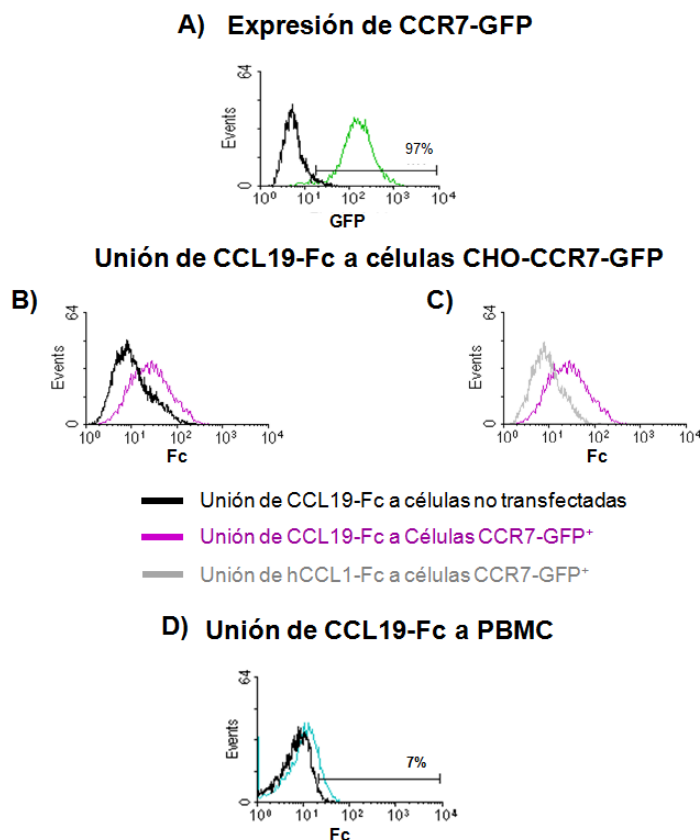


Figura 56. Histogramas que representan la unión de la quimioquina recombinante CCL19-Fc y los controles utilizados para confirmar la especificidad del marcaje. **A)** Expresión del CCR7-GFP en las células utilizadas en este ensayo **B)** Unión de CCL19-Fc a células CHO (línea negra) y a células CHO-CCR7-GFP (línea morada). **C)** Unión de las quimioquinas hCCL1-Fc (línea gris) y CCL19-Fc (línea morada) a células CHO-CCR7-GFP. **D)** Unión de CCL19-Fc a PBMC (línea azul), como control negativo se utilizó sobrenadante de células CHO sin transfectar (línea negra).

2.2.8.3 Columnas con anticuerpos monovalentes que reconocen la porción Fc de IgG humana.

Debido a la pérdida de actividad observada durante el proceso de purificación con las columnas de proteína A, consideramos la posibilidad de enriquecer la concentración y actividad de esta quimioquina, sustituyendo las columnas de proteína A por una columna de afinidad acoplada con anticuerpos de llama (*Lama glama*), específicos frente a la IgG humana, al ser de este origen la porción Fc fusionada al CCL19. Los anticuerpos de llama carecen de cadenas ligeras y resultan más estables en los procesos de elución que los anticuerpos convencionales

(Moulin, M et al. 2002; Verheesen, P et al. 2003). El uso de estas columnas evita la necesidad de la adaptación de la línea estable CCL19-Fc a un medio libre de SFB, al unirse de forma específica al fragmento Fc de nuestra proteína recombinante.

Para determinar las condiciones más favorables de elución, realizamos una serie de experimentos a pequeña escala con diferentes tampones, eligiendo las más favorables para optimizar la recuperación de la proteína. Se escogieron diferentes tampones, con pH tanto ácido como básico y con alta concentración de sales. Estos tampones son de uso habitual en la elución de proteínas en cromatografías de afinidad, ya que no suelen alterar su conformación nativa. Para evaluar el proceso de purificación se utilizaron los mismos parámetros que en la purificación con columnas de proteína A. En total se utilizaron seis tampones de elución diferentes, cuya composición se detalla en “Material y métodos”. Tres de ellos (Glicina-HCl 0,1M pH2, Glicina 0,1M -NaCl 0,5M pH2 y Tris-acetato 0,1M NaCl 2M pH 7,7) fueron descartados puesto que no lograron eluir la proteína de forma eficiente.

Usando los otros tres tampones (ácido cítrico 0,1M pH2, glicina-NaOH 0,1M pH10 y DEA 50mM pH11) obtuvimos una buena recuperación de proteína total y evaluamos su actividad mediante experimentos de migración con PBMC. La migración máxima observada con el sobrenadante se obtuvo con éste sin diluir, a una concentración de 2,4 µg/ml. Respecto a la proteína purificada, con el tampón de ácido cítrico no se recuperaba mucha actividad quimiotáctica después de la purificación y también fue descartado (Tabla 10).

	Volumen (ml)	µg /ml	Unidades de actividad (U/ml)	Actividad inicial	% Actividad recuperada	Actividad específica	% Pureza
SOBRENADANTE	6.5	2,43	6	39	---	2,4	---
ELUIDO AC. CÍTRICO (Fracción 1)	0,5	22,5	10	5	12.8	0,4	ND
ELUIDO GLICINA NaOH (Fracción 1)	0,5	25	20	10	25	0,8	90
ELUIDO DEA (Fracción 2)	0,5	26	60	30	77	2,3	95

Tabla 10. Rendimiento de la purificación de proteína CCL19-Fc dependiendo del tampón utilizado en columnas con anticuerpos de llama anti-IgG humana.

La máxima migración celular de PBMC observada ocurre con 2 µg/ml de proteína eluida con el tampón DEA. Observamos que menores cantidades de proteína eluida con el tampón DEA, inducen mayor migración que la mayor concentración evaluada de proteína eluida con Glicina-NaOH (Figura 57). Esto indicó que con el tampón DEA recuperábamos más cantidad de proteína activa.

Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores en la purificación de CCL19 y su función en quimiotaxis, por ejemplo Britschgi et al utilizan 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de quimioquina CCL19 purificada para producir migración de linfocitos esplénicos en ratón (Britschgi, MR et al. 2008). Yoshida et al utilizan también 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CCL19 humana para producir migración en linfocitos frescos (Yoshida, R et al. 1998b).

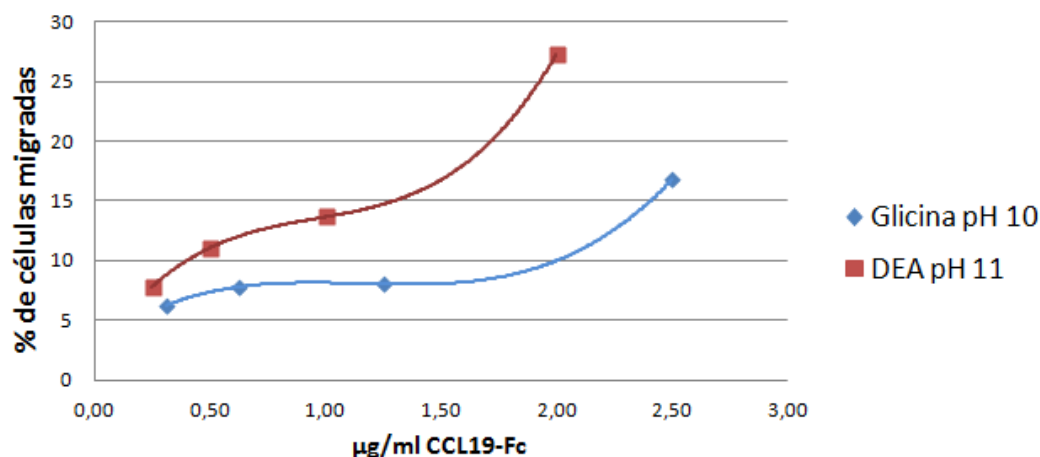


Figura 57. Experimento de migración con CCL19-Fc purificado. Porcentaje de células que migraron en respuesta a la quimioquina, con respecto a las células

Una vez puesto a punto este método de purificación que nos permitía recuperar la mayor cantidad de proteína específica posible, conservando su actividad quimiotáctica, utilizamos el tampón DEA para purificar cantidades mayores de proteína y comprobamos la expresión, pureza y actividad de la misma una vez purificada, tal como habíamos hecho anteriormente (Figura 58).

La proteína así purificada fue concentrada alrededor de 50 veces con respecto al sobrenadante, en un solo paso, lográndose una recuperación de más del 80% de la cantidad inicial y con una pureza de más del 90%. También presentaba actividad quimiotáctica mostrando una curva dosis-respuesta, observándose inhibición de la quimiotaxis a concentraciones superiores de 18,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, recuperándose más del 60% de la actividad quimiotáctica inicial.

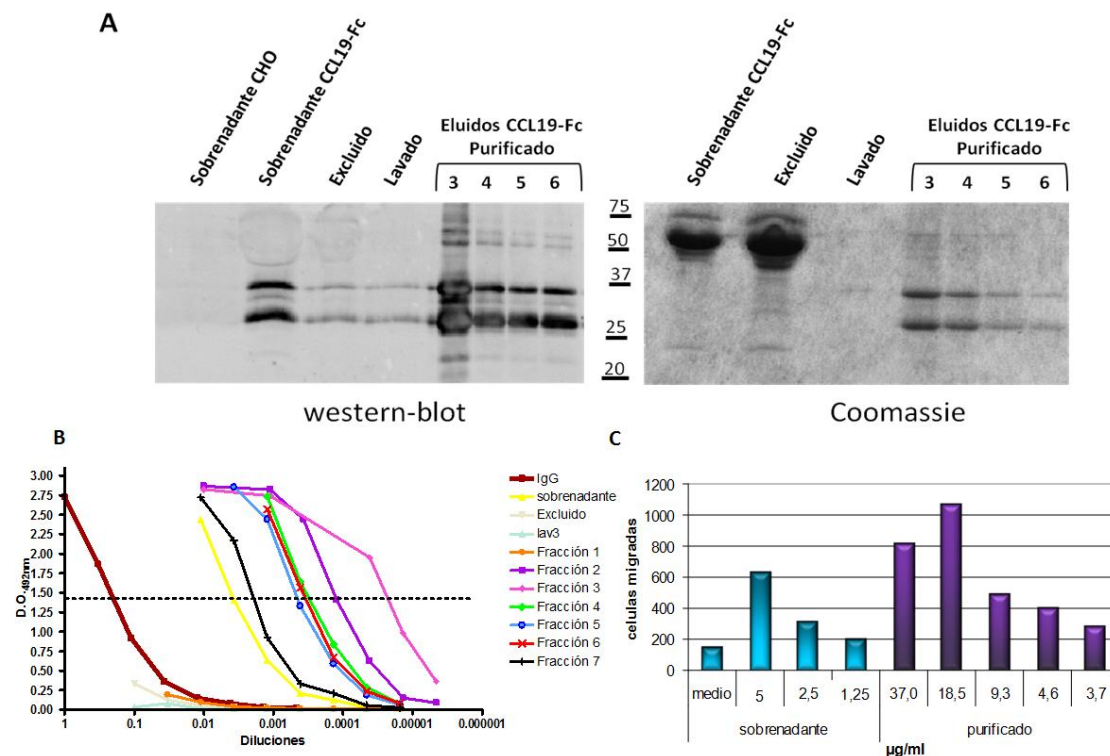


Figura 58. A) Detección de la proteína CCL19-Fc en los distintos pasos de la purificación por western-blot y coomassie. Se aplicó al gel 30 µl de todas las muestras. B) Determinación mediante ELISA de la concentración de CCL19-Fc en las diferentes fracciones de purificación. La línea más gruesa corresponde a la curva patrón de IgG humana purificada con una concentración inicial de 0,1µg/ml. C) Migración de PBMC en respuesta a CCL19-Fc antes y después de la purificación. Experimento representativo de 3 realizados

En estas condiciones de elución y con una concentración de 3 µg/ml la proteína purificada es capaz de unirse a PBMC (Figura 59A) y a las células de la línea CHO-CCR7-GFP, pero no a células CHO (Figura 59B).

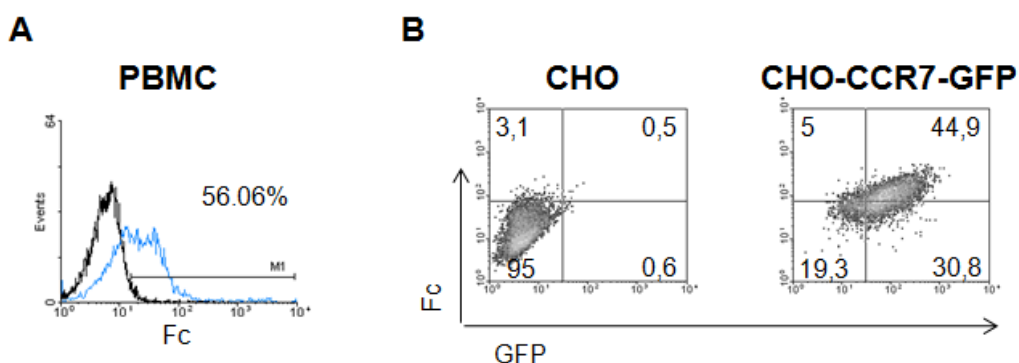


Figura 59. A) Unión de CCL19-Fc a PBMC (línea azul), como control se utilizó sobrenadante de células CHO (línea negra). B) Unión de CCL19-Fc a células CHO y a células CCR7-GFP. Los números indican los porcentajes de células en cada cuadrante. CCL19-Fc se utilizó a una concentración de 3 µg/ml.

2.2.9 Unión de CCL19-Fc a las subpoblaciones de monocitos.

Dado que los monocitos $CD14^+SLA-II^+$ migraron en respuesta a los ligandos de CCR7, una vez fijadas las condiciones óptimas para los ensayos de unión de la quimioquina CCL19-Fc, quisimos analizar la unión de CCL19-Fc a su receptor en las subpoblaciones de monocitos $CD14^{alt}SLA-II^-$, $CD14^+SLA-II^+$ y $CD14^-SLA-II^+$. Para ello se realizaron marcajes en suspensiones de monocitos enriquecidos mediante separación magnética, utilizando los AcMo anti-CD14 y anti-SLA-II. Se observó unión de la quimioquina CCL19-Fc a la subpoblación $CD14^+SLA-II^+$, mientras que en las subpoblaciones de monocitos $CD14^{alt}SLA-II^-$ y $CD14^-SLA-II^+$ no se observó unión de la misma (Figura 60).

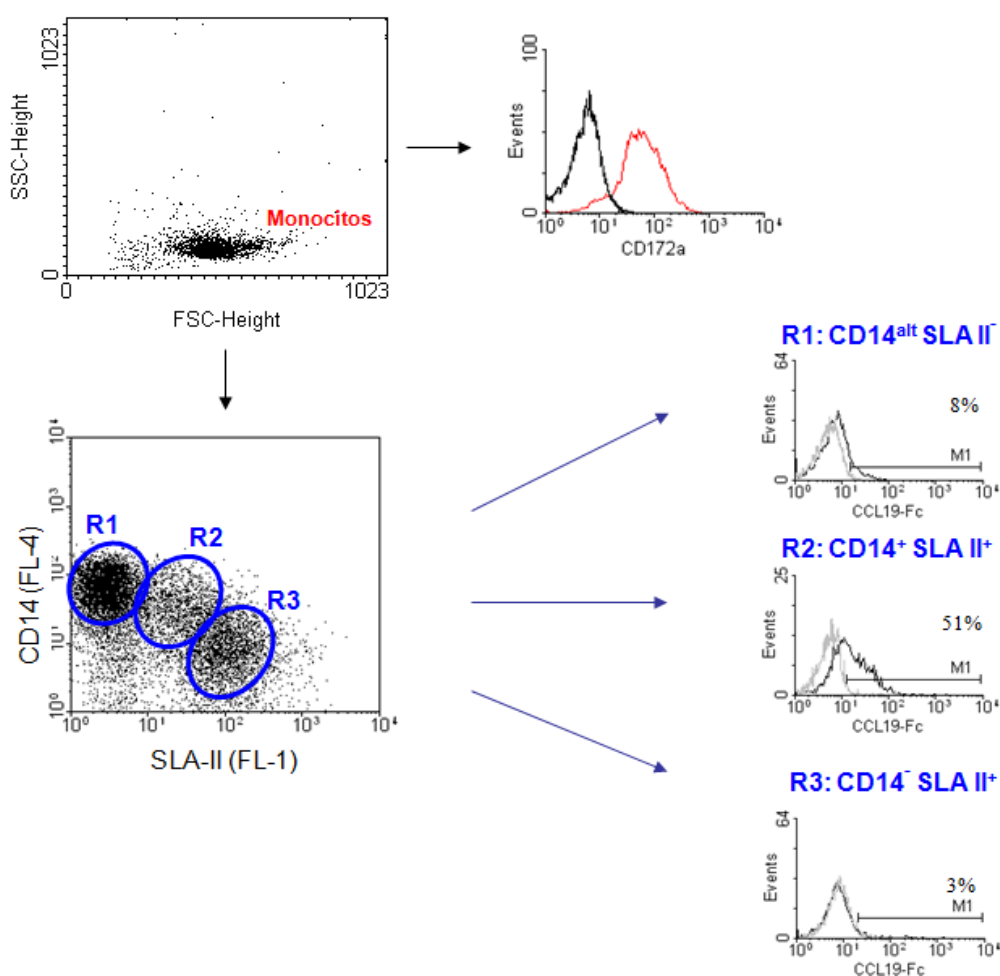


Figura 60. Unión de CCL19-Fc a las distintas subpoblaciones de monocitos porcinos. Se realizaron marcajes triples en monocitos enriquecidos, con los AcMo anti-CD14 y anti-SLA-II y con la quimioquina recombinante CCL19-Fc. La pureza de los monocitos se comprobó mediante un marcaje con un AcMo anti-CD172a (histograma en rojo). Los histogramas en gris representan el control negativo de fluorescencia para cada subpoblación. Experimento representativo de 3 realizados con diferentes animales.

3. RESPUESTA QUIMIOTÁCTICA DE LINFOCITOS A LOS LIGANDOS DE CCR7. UNIÓN DE CCL19-FC.

La expresión del receptor CCR7 ha sido muy estudiada sobre todo en ratón, donde se ha visto que este receptor tiene un papel crítico en la circulación de los linfocitos T. CCR7 es necesario para la migración de los linfocitos hacia los órganos linfoides secundarios y para la movilidad y retención celular dentro de estos órganos. La importancia de CCR7 y de sus dos ligandos CCL19 y CCL21 ha quedado demostrada en los ratones CCR7^{-/-} y plt/plt (carentes de los genes de CCL19 y CCL21 expresados en órganos linfoides secundarios), ya que ambos presentan defectos severos en la migración y el posicionamiento de las células T, así como en la respuesta inmune.

Aunque, hasta ahora nos habíamos centrado en el estudio de la expresión de los receptores de las quimioquinas en monocitos, la especial importancia que tiene el receptor CCR7 en el tráfico de los linfocitos nos hizo interesarnos por su expresión en estas células, de lo que no hay datos en la especie porcina.

3.1 Respuesta quimiotáctica de linfocitos a las quimioquinas CCL19 y CCL21

Las quimioquinas CCL19 y CCL21 se expresan de forma constitutiva en los órganos linfoides secundarios, y son fundamentales en la organización del tráfico de los linfocitos. Estas quimioquinas presentan diferencias con otras quimioquinas constitutivas como CXCL12 a la hora del reclutamiento de distintas células in vivo en humano (Luther, SA et al. 2002), por ello hemos estudiado la respuesta quimiotáctica de diferentes subpoblaciones de PBMC porcinos a CCL21 y CXCL12. Para ello se analizó el fenotipo de las células que migraron en respuesta a las quimioquinas, recogidas de la cámara inferior de las placas *transwell*.

El análisis se realizó inicialmente sobre poblaciones amplias, pasando después a poblaciones más restringidas. En primer lugar comparamos las poblaciones de células CD3⁺ (células T) y CD21⁺ (células B). Las células CD3⁺ respondieron a las dos quimioquinas estudiadas, disminuyendo sin embargo su porcentaje en la población migrada total. El porcentaje inicial de células CD3⁺ era de más del 70%, mientras que en las células recogidas de la cámara inferior de la placa *transwell* era del 60% y del 57% en las células que respondieron a CCL21 y CXCL12 respectivamente. Las células CD21⁺ aumentaron su porcentaje en las células

recogidas después de la migración, ya que en la población inicial suponían el 5% y en las células respondedoras a CCL21-GFP representaban el 28% y en las células respondedoras a CXCL12-GFP el 29% (Figura 61).

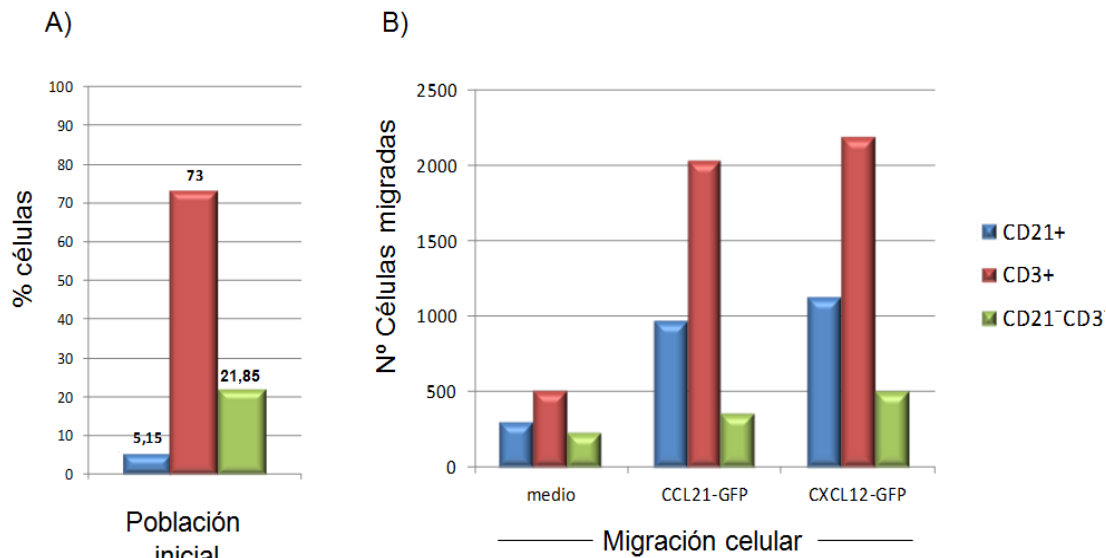


Figura 61. A) Porcentaje de células CD21⁺ y CD3⁺ en la población inicial. **B)** Número de células que migraron hacia las quimioquinas CCL21-GFP y CXCL12-GFP. Las células se recogieron y marcaron con AcMo anti-CD21 y anti-CD3. Experimento representativo de 4 experimentos con diferentes animales.

Posteriormente se realizaron migraciones para estudiar si las quimioquinas inducían migración selectiva de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. Cuando se comparó las proporciones de las poblaciones CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ o CD4⁻CD8⁻ en las células iniciales y en las recogidas de la cámara inferior de la placa transwell, observamos un aumento de las células CD4⁺CD8⁻ pasando del 5% al 9,8% en las que responden a CCL21 y al 8,1% en las que responden a CXCL12. También observamos un aumento de las células CD4⁺CD8⁺ en las células que responden a CCL21 (17,2%) y CXCL12 (19%) con respecto a las células de la población inicial (9,3%). No se encontró un aumento de la proporción de las células CD4⁻CD8⁺ en respuesta a CCL21, pero si aumento su proporción en las células respondedoras hacia CXCL12 (Figura 62).

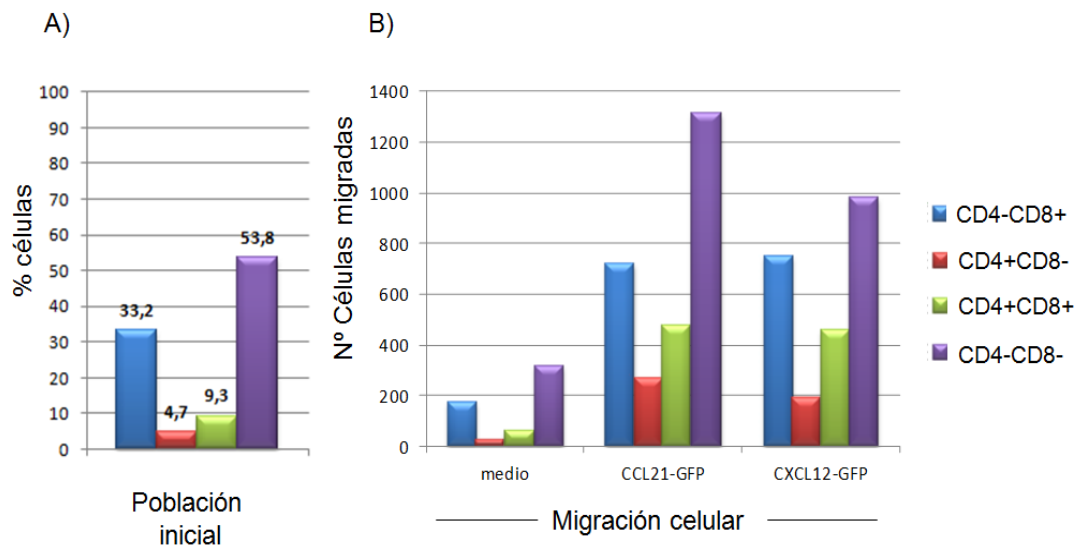


Figura 62. A) Porcentaje de células CD4-CD8⁺, CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ y CD4-CD8⁻ en la población inicial. **B)** Número de células que migraron hacia las quimioquinas CCL21-GFP y CXCL12-GFP. Las células se recogieron y marcaron con AcMo anti-CD4 y anti-CD8 α . Experimento representativo de 4 realizados con diferentes animales.

Por último, hemos estudiado la respuesta de la población marcada por el AcMo 2E3, un marcador que divide a las células CD4 en dos subpoblaciones con características de células de memoria (CD4⁺2E3⁻) y *naïve* (CD4⁺2E3⁺), en estas últimas también se ha detectado por PCR la presencia de mRNA de CCR7 (Revilla, C et al. 2005a). No se encontró migración selectiva de ninguno de los dos tipos celulares cuando se comparó la proporción de células 2E3⁻/2E3⁺ referida a las células CD4⁺ en las células iniciales (58%/42%) con la proporción de las recogidas de la cámara inferior de la placa transwell en respuesta a CXCL12 (60%/40%). Sin embargo sí se encontró un enriquecimiento significativo de la población 2E3⁺ en las células que responden a CCL19 (28%/72%) y en las que responden a CCL21 (32%/62%), es decir: los dos ligandos de CCR7 inducen la migración preferente de las células CD4⁺2E3⁺, lo que está en consonancia con la detección de los transcritos de CCR7 en estas células (Figura 64).

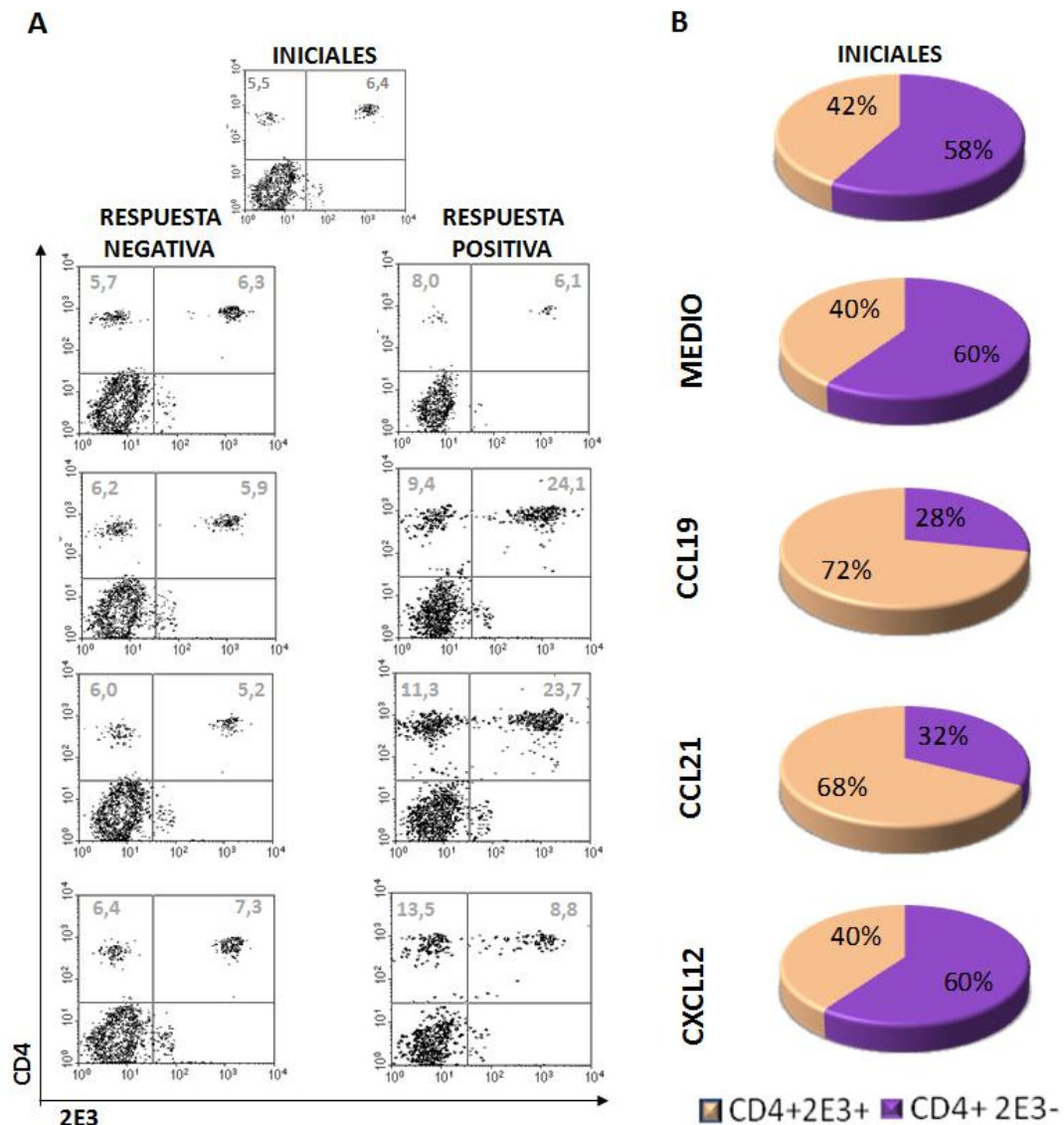


Figura 63. Estudio de la respuesta quimiotáctica de las poblaciones de linfocitos T CD4+2E3+ y CD4+2E3⁻. Las células que migraron se recogieron y marcaron con AcMo anti-CD4 y anti-2E3. **A)** Diagrama de puntos de las poblaciones según los marcadores 2E3 y CD4, en las células que no migraron (respuesta negativa) y en las células que migraron (respuesta positiva). **B)** Porcentaje de células 2E3⁺ y 2E3⁻ referidas a la población total de células CD4⁺. Datos representativos de 5 experimentos con diferentes animales.

3.2 Unión de CCL19-Fc a PBMC.

El receptor CCR7 controla la migración de los linfocitos hacia los órganos linfoides secundarios. Su expresión se ha asociado a células T naïve y a una subpoblación de células T de memoria, llamada de memoria central (Sallusto, F et al. 1999). La obtención de CCL19-Fc y su capacidad de unirse a las células que expresan el receptor CCR7 nos ha permitido analizar la unión de esta quimioquina

a diferentes tipos celulares. La presencia de células positivas para el receptor de CCL19 se determinó en una primera fase sobre PBMC mediante análisis por citometría de dos colores utilizando diferentes AcMo que reconocen a las principales subpoblaciones de linfocitos porcinos, CD3, CD21, CD4, CD8 α , CD8 β (Figura 64).

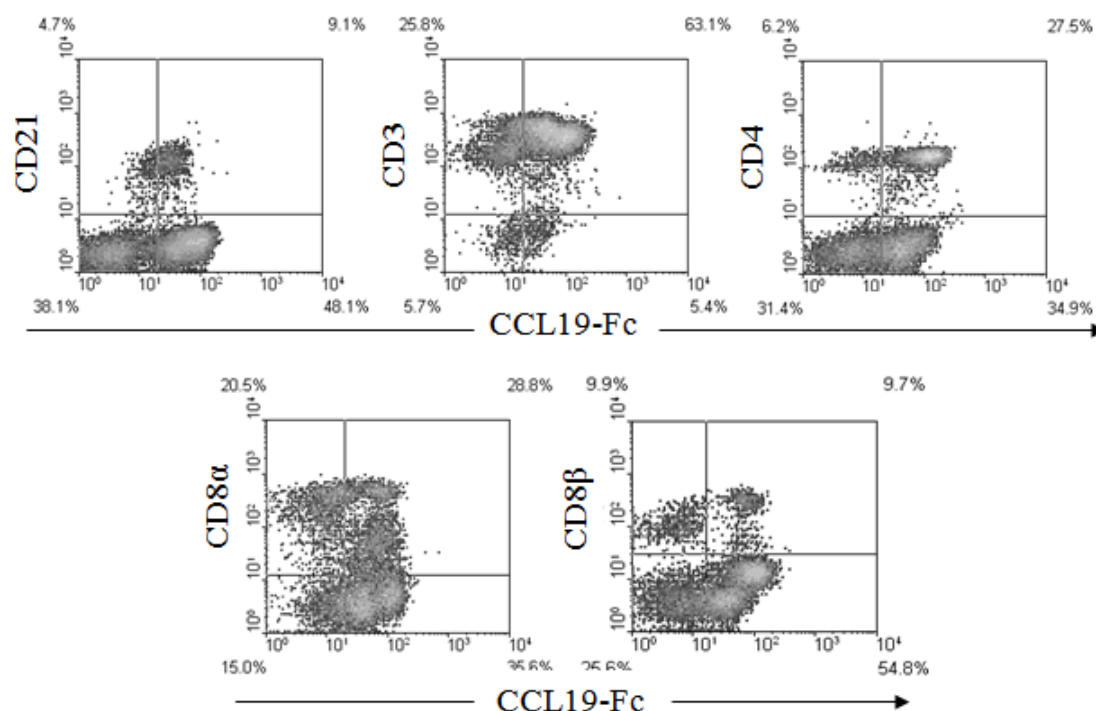


Figura 64. Análisis por citometría de dos colores de la unión de CCL19 a PBMC. Las células fueron marcadas con los anticuerpos indicados revelados con RaM-FITC y posteriormente con CCL19-Fc que fue revelado con un anticuerpo anti-hIgG marcado con biotina y estreptavidina-PE. Las tinciones se realizaron sobre PBMC, delimitando la región de linfocitos mediante su perfil de FSC y SSC. Experimento representativo de 4 realizados con distintos donantes.

Más del 60% de las células CD21⁺ se mostraron positivas para CCL19-Fc. Por otra parte, más del 50% de las células CD3⁺ mostraron unión al CCL19-Fc. Alrededor del 70% de las células CD4⁺ unían CCL19. Respecto a CD8 α , se observó unión de CCL19-Fc en el 20% de las células CD8 α ^{alt} y en más del 80% de las CD8 α ^{bajas}. Por último la mitad de las células CD8 β ⁺ fueron positivas para CCL19-Fc, lo que sería compatible con la expresión de CCR7 descrita en el ratón por otros autores en las células T CD8 naïve, pero no en las CD8 efectoras (Unsoeld, H et al. 2004). En la mayoría de los animales analizados (3 de 4) se podían diferenciar dos

niveles de expresión del marcador CD8 β , con más intensidad del marcaje en las células que unen CCL19-Fc

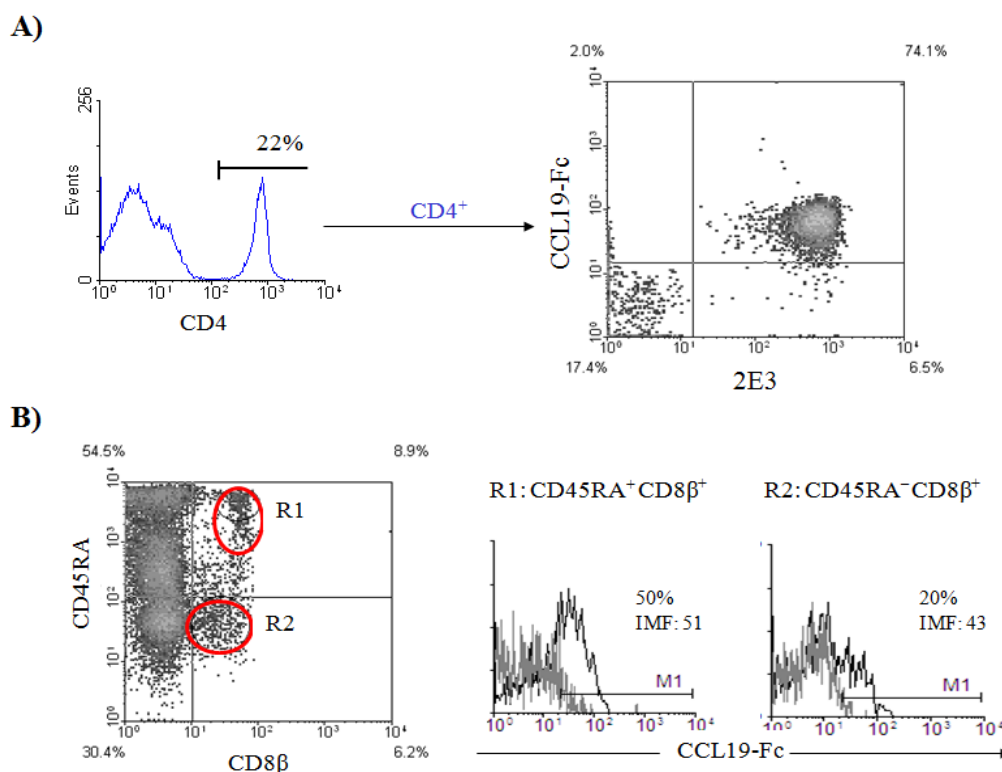


Figura 65. Unión de CCL19-Fc a las distintas subpoblaciones de linfocitos porcinos. **A)** Se realizaron marcajes triples en monocitos enriquecidos, con los AcMo anti-CD4, 2E3 y con la quimioquina. **B)** marcajes triples en monocitos enriquecidos, con los AcMo anti-CD45RA, anti-CD8 β y con la quimioquina. Los histogramas en gris representan el control negativo de fluorescencia para cada subpoblación. Experimento representativo de 3 realizados con diferentes animales.

En una fase posterior, se abordó en mayor detalle la caracterización de las células que unen CCL19. Para analizar la unión de CCL19-Fc a las células 2E3⁻ y 2E3⁺ se realizaron marcajes triples de PBMC con anticuerpos anti-CD4 y 2E3, seguidos del marcaje con nuestro CCL19-Fc. Se observó que las células CD4⁺2E3⁺, pero no las CD4⁺2E3⁻ unen CCL19-Fc, estos resultados apoyan los datos obtenidos en los ensayos de migración (Figura 65A). También se realizaron marcajes triples de PBMC con los anticuerpos anti-CD8 β y CD45RA. Así, observamos que CCL19-Fc se une a más porcentaje de las células CD45RA⁺CD8 β ⁺, sin embargo también observamos cierta unión a células CD45RA⁻CD8 β ⁺. Además, al igual que se había observado anteriormente, también aquí se observa que la población CD45RA⁺

CD8 β ⁺, que une mas CCL19-Fc, expresa niveles más altos de CD8 β que la población CD45RA⁻CD8 β ⁺ que no une tanto CCL19-Fc (Figura 65B).

4. EVALUACIÓN DEL EFECTO ADYUVANTE DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN UN MODELO DE INMUNIZACIÓN CON DNA.

4.1 Modelo experimental

La capacidad de la quimioquina CCL2 de reclutar monocitos hacia lugares de inflamación es una característica bien conocida. Además, se ha descrito que los monocitos CCR2⁺ que son capaces de responder a CCL2, no solo son precursores in vivo de DC (Geissmann, F et al. 2008), sino que también tienen capacidad de presentar el antígeno a las células T y son capaces de estimular su proliferación (Randolph, GJ et al. 2008). Por esto consideramos que la quimioquina CCL2 podría ser un buen candidato para ser utilizado como adyuvante en vacunas DNA.

Se realizó un experimento in vivo para evaluar la capacidad inmunoadyuvante del CCL2 en la respuesta frente a la nucleoproteína N del virus Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (SRRP), en un modelo de inmunización con DNA. Se eligió la proteína N como antígeno modelo, porque se dispone de un método ELISA para valorar la producción de anticuerpos frente la misma, además de plásmidos y anticuerpos para detectarla, y porque es capaz de inducir una respuesta proliferativa (Bautista, EM et al. 1999).

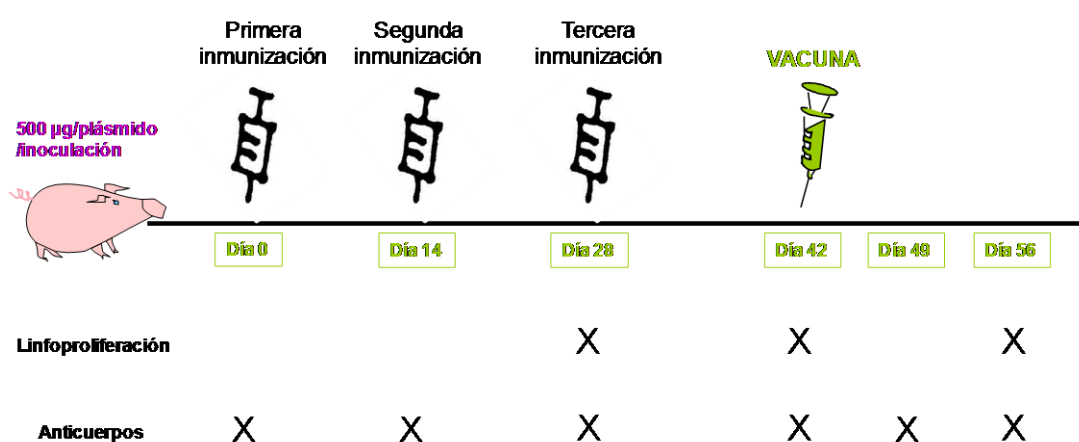


Figura 66. Esquema con las pautas de inmunización y el calendario de recogida de muestras.

Para llevar a cabo el ensayo se establecieron tres grupos de cinco animales que se inocularon con las distintas construcciones: Grupo 1: plásmido vacío

(pcDNA3.1+); Grupo 2: plásmido pcDNA3.1 (+) con la secuencia de la ORF7 del virus del SRRP (spORF7), obtenido previamente en nuestro laboratorio; Grupo 3: plásmido con la secuencia de la quimioquina CCL2-GFP combinado con el plásmido que codificaba la nucleoproteína (pCCL2-GFP + spORF7).

Los cerdos se inmunizaron con tres dosis de 500 µg de plásmido por vía intramuscular espaciadas dos semanas (días 0, 14 y 28). Debido a la imposibilidad de utilizar virus infeccioso en las instalaciones del animalario, en lugar de ello, los cerdos se inocularon con una vacuna inactivada del vSRRP, dos semanas después de la última inmunización (día 42) (Figura 63). En los cerdos inmunizados se estudió la respuesta linfoproliferativa y la presencia de anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína N a lo largo del periodo de inmunización y hasta el día 56 (figura 66).

4.2 Detección de la respuesta humoral

La presencia de anticuerpos en sangre se determinó en los días 0, 14, 28, 42, 49 y 56 (Figura 67).

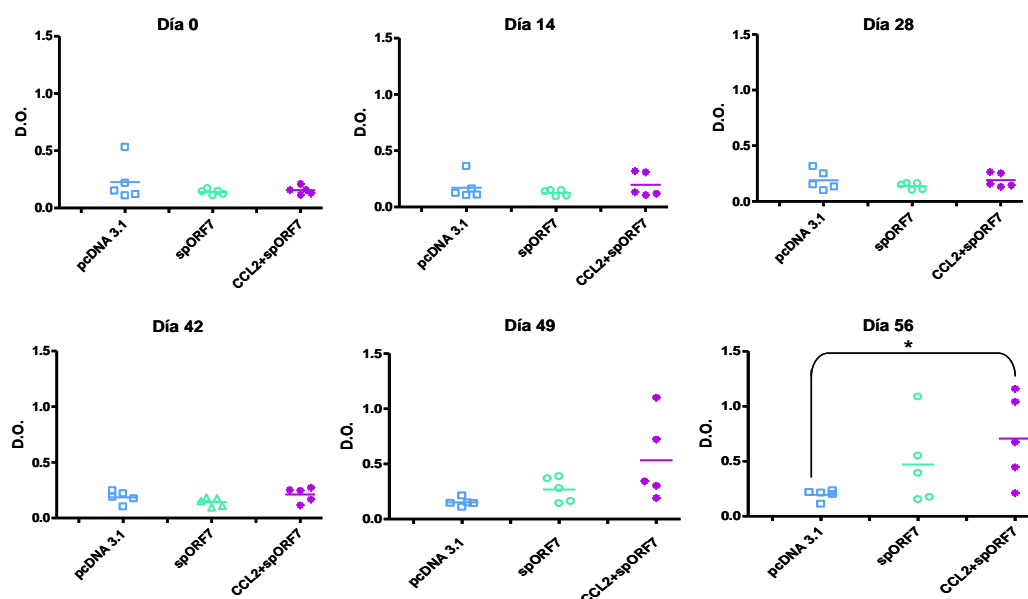


Figura 67. Detección de anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína N del virus SRRP mediante ELISA. En las gráficas se muestra la densidad óptica obtenida y la media de cada grupo (líneas horizontales continuas). Como control negativo se utilizaron los sueros de los cerdos inmunizados con el plásmido pcDNA3.1. El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Mann-Whitney. * = $p \leq 0.05$

4.3. Proliferación

Se realizaron ensayos de proliferación utilizando PBMC recogidos en los días 28, 42 y 56. Posteriormente estos se estimularon con diferentes cantidades del virus del SRRP. En ninguno de los tiempos señalados se obtuvieron niveles de proliferación detectables en respuesta al virus en un ensayo de incorporación de timidina tritiada.

DISCUSIÓN

El uso de quimioquinas recombinantes como ligandos para la detección de las células portadoras de sus receptores ha sido uno de los objetivos de esta tesis. La generación de este tipo de herramientas es fundamental en el cerdo, donde hasta la fecha no existen anticuerpos frente a la mayoría de los receptores de quimioquinas. El uso de quimioquinas recombinantes, solas o en combinación con anticuerpos, puede ser de gran utilidad en la caracterización de poblaciones celulares del sistema inmunitario.

Se han descrito numerosos sistemas de producción de proteínas recombinantes como bacterias, levaduras, hongos filamentosos, plantas o células de insecto. Nosotros elegimos como sistema de producción las células de mamífero, a pesar de su elevado coste de mantenimiento, porque contienen la maquinaria celular necesaria para el correcto plegamiento, secreción y modificación post-traduccional de las proteínas recombinantes (Wurm, FM 2004).

El primer abordaje utilizado fue la fusión de las quimioquinas a GFP. La fusión con GFP ha sido ampliamente utilizada para realizar el seguimiento de las proteínas de fusión sin necesidad de otro marcaje. Además, a pesar de su gran tamaño (26 kDa) en comparación con las quimioquinas (en torno a 10 kDa), no parece tener efecto en el comportamiento de las proteínas *in vivo* (Olson, KR et al. 1995).

Hemos obtenido las proteínas de fusión con las quimioquinas CCL2 (ligando de CCR2), CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7) y la proteína GFP. Las quimioquinas fusionadas a GFP, producidas en células CHO fueron detectadas mediante *western-blot*, tanto en los lisados como en los sobrenadantes de las líneas celulares que las expresaban, cuando se revelaron con un AcMo anti-GFP. Sin embargo, en los *western-blot* del sobrenadante y lisado de las células CCL2-GFP y en el lisado de CCL19-GFP, se encontraron dos bandas, una de 38-39 kDa que correspondería a la proteína de fusión quimioquina-GFP, y otra de 26 kDa a la GFP, que se habría expresado de forma independiente, a causa de no haber eliminado su codón de iniciación en la construcción. En algún caso se encontró una tercera banda con un peso molecular doble del de las proteínas de fusión, que correspondería a dímeros de las quimioquinas. La dimerización de quimioquinas se ha descrito en situaciones semejantes, dependiendo de su concentración y del pH del medio (Lowman, HB et al. 1997).

Para comprobar que las quimioquinas recombinantes conservaban su actividad funcional, se realizaron experimentos de migración con PBMC y con algunas de sus subpoblaciones. Las quimioquinas recombinantes obtenidas mostraron actividad quimiotáctica en todos los casos, aunque con frecuencia esta actividad se perdía rápidamente con la dilución.

Aunque CCL2 es capaz de actuar sobre distintos tipos celulares, como células T y células NK, fue descrito inicialmente como un potente factor quimiotáctico de monocitos (Deshmane, SL et al. 2009). En este sentido, comprobamos que la acción quimiotáctica fue mucho mayor sobre las células CD172a⁺ (monocitos) que sobre las células CD172a⁻ (linfocitos), a diferencia de lo que ocurre en la respuesta a CXCL12, cuyo receptor CXCR4 se expresa constitutivamente en un amplio rango de células sanguíneas, y con el que no encontramos diferencias en la migración de monocitos y linfocitos (Eash, KJ et al. 2009; Pablos, JL et al. 1999; Patrussi, L et al. 2008). Además, la proteína CCL2-GFP así producida fue capaz de unirse a su receptor de forma específica, es decir, se obtuvo en los sobrenadantes con la conformación adecuada y en la concentración suficiente para permitir la detección de la unión por citometría de flujo. La especificidad de la unión de CCL2 a su receptor, se comprobó mediante experimentos de bloqueo con la quimioquina fusionada a V5-HIS. CCL2-V5-HIS produjo una clara disminución de la unión de CCL2-GFP a los monocitos.

Las quimioquinas CCL19 y CCL21 tienen un papel muy importante en la migración de los linfocitos T *naïve* y de las células dendríticas hacia los órganos linfoides secundarios, donde se expresan de forma constitutiva (Ott, TR et al. 2004). La actividad de las quimioquinas recombinantes porcinas CCL19-GFP y CCL21-GFP se comprobó mediante ensayos de quimiotaxis. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta quimiotáctica de las células CD172a⁻ y CD172a⁺ a estas quimioquinas. Sin embargo, CCL19 presentó mayor actividad quimiotáctica que CCL21 cuando se utilizaron a la misma concentración, determinada por titulación en *dot-plot*. En este sentido, se ha descrito que CCL19 se une a CCR7 con una afinidad ligeramente mayor que CCL21 y, aunque ambos ligandos inducen movilización de calcio y quimiotaxis, algunos autores sostienen que el CCL19 murino es más potente cuando se encuentra en concentraciones bajas (Britschgi, MR et al. 2008).

Como herramienta suplementaria, en nuestro estudio generamos una línea estable de células CHO que expresan en su membrana el CCR7 porcino fusionado en su extremo carboxi-terminal a la GFP. Estas células han resultado muy útiles en varios aspectos. Por un lado, estas células son capaces de responder a los ligandos del receptor en ensayos de quimiotaxis, a diferencia de la línea parental CHO de la que proceden. Por otro lado nos han servido para comprobar por citometría de flujo la unión a las mismas de CCL19 y CCL21 y así demostrar su especificidad por el receptor CCR7. Aunque tanto CCL19 como CCL21 inducían la migración de células CCR7-GFP y PBMC, CCL21 fue menos eficiente como agente quimiotáctico. Esto puede ser debido a que, al igual que se ha descrito en el ratón (Britschgi, MR et al. 2008), el CCL19 porcino muestra mayor afinidad por CCR7 que el CCL21.

Al contrario de lo que ocurrió con la quimioquina CCL2-GFP, a la que podíamos detectar unida a su receptor por citometría de flujo, no sucedió lo mismo con las proteínas recombinantes CCL19-GFP ni CCL21-GFP, aunque fueran capaces de inducir quimiotaxis sobre PBMC. El hecho de que la detección de las proteínas en *western-blot* fuera muy débil parecía indicar que la causa de que no se detectara la unión a su receptor se debía a que no había cantidad suficiente en el sobrenadante de cultivo. De hecho, cuando se realizaron los experimentos de migración celular, se observó una rápida caída de la actividad quimiotáctica con la dilución, lo que sugería también que la cantidad de quimioquina en los sobrenadantes estaba en el límite de la concentración necesaria para inducir quimiotaxis.

En este sentido se ha descrito que las cantidades de quimioquina requeridas para inducir quimiotaxis son menores que las necesarias para la detección de receptores por citometría (Britschgi, MR et al. 2008). Este hecho se ha descrito en varias quimioquinas, como CXCL12, CCL2 o CCL21, de las se requiere de 4 a 10 veces más cantidad para su uso como ligando en la detección de sus respectivos receptores por citometría de flujo. En concreto, la quimioquina CCL19 murina produce la máxima migración con concentraciones de 0,3 µg/ml sobre células transfectadas con CCR7, mientras se necesitan concentraciones de hasta 8 µg/ml para visualizar la unión a su receptor por citometría de flujo (Britschgi, MR et al. 2008; Yoshida, R et al. 1998b; Yoshida, R et al. 1998a).

Con la finalidad de facilitar la purificación de la quimioquina CCL19, decidimos clonarla como proteína de fusión con el fragmento Fc de la IgG1 humana. La fusión con el fragmento Fc posibilita la detección y purificación de la proteína recombinante con reactivos como proteína A o G o con anticuerpos específicos para Igs humanas (Yang, Q et al. 2010). La fusión con Fc ayuda a paliar la toxicidad que pueden presentar algunas proteínas en el interior celular e incluso en algunos casos favorece un aumento de la expresión y secreción de las proteínas recombinantes producidas en células de mamífero (Lo, KM et al. 1998). Este abordaje se ha utilizado con distintas quimioquinas en otras especies, tanto para su uso como ligando en la detección de sus receptores, como para su purificación a través del Fc (Gutierrez, J et al. 2004; Suzuki, T et al. 2010).

La detección en los análisis por *western-blot* de dos bandas en los lisados y en los sobrenadantes de las células que expresaban CCL19-Fc y CCL1-Fc, reflejaba la existencia de dos isoformas, probablemente debido a modificaciones post-traduccionales como glicosilación o a proteólisis. Sin embargo, el hecho de que no apareciesen fragmentos de menor tamaño, de que ninguna de las dos formas se acumulase con el tiempo en cultivo, y la existencia en la secuencia de posibles sitios de N-glicosilación, sugiere dos formas de N-glicosilación diferentes, y no productos de degradación. El análisis de la secuencia de aminoácidos de las proteínas mostró dos sitios de N-glicosilación en la proteína CCL1-Fc (uno en la quimioquina y otro en la porción Fc), y un sitio probable de N-glicosilación en el CCL19-Fc (en la porción Fc). Este sitio de N-glicosilación de la porción Fc de la IgG1 humana ha sido descrito en otras proteínas de fusión con Fc (Yang, Q et al. 2010). Considerando que cada N-glicosilación puede añadir 2,5 kDa de media al peso de la proteína, la aparición de la banda superior tanto en los *western-blot* como en los geles teñidos con *Coomassie*, indicaría que esos sitios están glicosilados, aumentando así el peso molecular en 2,5 kDa y 5 kDa en CCL19-Fc y CCL1-Fc, respectivamente, lo que concuerda con el tamaño de la banda superior observada (Kornfeld, R et al. 1985). Nuestros resultados indicarían que tanto la forma glicosilada, como la no glicosilada de la quimioquina se secretan al medio extracelular. Se han descrito resultados similares para otras quimioquinas, donde la banda superior en el *western-blot* corresponde a la proteína completamente glicosilada y la banda inferior a la forma no glicosilada. También se ha observado

la aparición de bandas con distintos grados de glicosilación en proteínas secretadas, producidas en células de mamífero (Ansari, IH et al. 2006; Gutierrez, J et al. 2004; Ierino, FL et al. 1993).

Para la producción de quimioquinas-Fc y su purificación en columnas de proteína A, se utilizó medio con SFB desprovisto de inmunoglobulinas bovinas para prevenir la purificación de estas junto con las proteínas de fusión. La alternativa más común para este problema es utilizar medio de cultivo sin suplemento de suero. Sin embargo, comparando ambos medios de cultivo, encontramos que la viabilidad celular y la producción de proteína recombinante es claramente mayor cuando se usa suero. En nuestros experimentos, los transfectantes estables obtenidos mostraron una buena capacidad de producción de proteínas recombinantes. Los niveles de expresión de proteínas recombinantes en el sobrenadante de cultivo de células de mamífero suelen variar entre 3 y 200 $\mu\text{g/ml}$, dependiendo de la construcción (Lo, KM et al. 1998). En nuestro caso se recuperaron entre 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de CCL19-Fc en el sobrenadante de cultivo, lo que está dentro del rango descrito. La proteína de fusión CCL19-Fc producida mantuvo su actividad quimiotáctica sobre PBMC. Además CCL19-Fc indujo la migración de las células CHO-CCR7-GFP, confirmándose su especificidad por el CCR7 porcino clonado, como era de esperar, aunque no se había demostrado experimentalmente.

Cuando se evaluó la capacidad quimiotáctica de la quimioquina purificada, tras su elución de la proteína A en medio ácido, se observó una pérdida de actividad respecto al sobrenadante. Aunque se recuperaba prácticamente toda la proteína recombinante presente en el sobrenadante, con una pureza del 85%, solo se conseguía un 20% de su actividad. La baja actividad de la proteína purificada se pudo comprobar, no sólo por la necesidad de concentraciones altas de quimioquina para inducir la migración de las células CHO-CCR7-GFP (en torno a 20 $\mu\text{g/ml}$), sino también por su capacidad limitada para unirse a estas células. En estos experimentos, aunque la quimioquina-Fc se unía a la mayoría de las células, como reflejaba el perfil unimodal obtenido por citometría de flujo, la intensidad del marcaje era baja comparada con la expresión del receptor en la línea estable. La imposibilidad de detectar la unión a su receptor en PBMC sugería también una cierta inactivación durante el proceso de purificación.

La pérdida de la actividad de la quimioquina observada durante el proceso de purificación parecía ser debida a las condiciones de la elución. Se ha descrito que el uso de tampones ácidos para la elución de proteínas de columnas de afinidad puede afectar al plegamiento de las mismas y a su funcionalidad (Yarden, Y et al. 1985), por lo que decidimos emplear otro tipo de columnas para aumentar la cantidad de proteína purificada activa. Se emplearon columnas de afinidad de anticuerpos monovalentes de llama (*Lama glama*), específicos frente a la IgG humana, que por su naturaleza monomérica permiten una elución eficiente de proteínas, con condiciones más suaves (Verheesen, P et al. 2003). Estas columnas presentan además la ventaja de su especificidad por inmunoglobulinas humanas, lo que nos permitió utilizar SFB en el medio de producción, al eliminar el riesgo de co-purificación de inmunoglobulinas bovinas junto a la proteína de interés.

Para la elución de CCL19-Fc probamos un amplio rango de tampones, ya que las condiciones de elución deben determinarse de forma empírica para cada proteína. Utilizamos seis tampones, tres con pH ácido (Glicina-HCl 0,1M pH2, Glicina 0,1M-NaCl 0,5M pH2 y ácido cítrico 0,1M pH2), dos con pH básico (glicina-NaOH 0,1M pH10 y DEA 50mM pH11) y uno con pH neutro con una alta concentración de sal (Tris-acetato 0,1M NaCl 2M pH 7,7) que son frecuentemente empleados en cromatografía de afinidad. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización del tampón DEA a pH 11, tanto en la recuperación de la proteína, como en la conservación de la actividad de la misma.

En esas condiciones, la proteína CCL19-Fc fue eluida de la columna de afinidad en varias fracciones activas, que en el análisis por SDS-PAGE mostraron el mismo patrón de bandas que el sobrenadante. La recuperación fue típicamente de más del 80% de la proteína recombinante total, concentrada alrededor 100 veces (de 2,5 µg/ml a 250 µg/ml, aproximadamente), con una pureza estimada del 95% y que conservaba más del 60% de su actividad.

El estudio de la capacidad quimiotáctica de CCL19-Fc en el sobrenadante mostró actividad sobre PBMC a una concentración en el rango descrito para esta quimioquina en otras especies, observándose migración de PBMC con 1 µg/ml. En humanos, las concentraciones de CCL19 utilizadas para inducir la migración de PBMC varían entre 0,2 y 2 µg/ml (Britschgi, MR et al. 2008; Kim, CH et al. 1998; Pilkington, KR et al. 2004).

Posteriormente se realizaron ensayos de unión a su receptor, tanto sobre las células CHO-CCR7-GFP, como sobre PBMC. Para ver unión en el modelo murino, el CCL19 se ha utilizado a concentraciones entre 1 y 8 $\mu\text{g/ml}$ (Britschgi, MR et al. 2008; Pilkington, KR et al. 2004; Unsoeld, H et al. 2002). En nuestro estudio, con una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ hemos podido detectar la unión del CCL19-Fc a las células CHO-CCR7-GFP, pero no a las células CHO sin transfectar, lo que confirma su especificidad por el receptor CCR7. Cuando se utilizó CCL19-Fc para marcar PBMC, se encontró un marcaje bimodal, reflejando una expresión heterogénea de su receptor en estas células, como era de esperar.

Tanto en humano como en ratón se ha identificado un receptor de la familia de los receptores atípicos (CCX-CKR) que es capaz de unir las quimioquinas CCL19 y CCL21, aunque no induce migración celular. Recientemente se ha clonado su ortólogo porcino, y presenta una homología de más del 85% con las secuencias humana y murina, sugiriendo funciones similares para esta proteína en el cerdo. Este receptor, al menos en ratón, no se expresa en células hematopoyéticas, por lo que no interferiría con la detección de CCR7 en linfocitos cuando utilizamos CCL19-Fc (Comerford, I et al. 2010; Heinzl, K et al. 2007; Meurens, F et al. 2009).

Por otro lado, en este tipo de ensayos las quimioquinas sólo se unen a receptores no ocupados por moléculas de quimioquina endógena, por lo que podrían existir diferencias entre el marcaje con quimioquinas y el marcaje con anticuerpos, que se unirían a todas las moléculas de receptor existentes en la membrana, sin distinguir si estaban ocupados o no. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en el marcaje cuando, antes de realizarlo, se mantuvieron las células a 37°C durante una hora, tiempo suficiente para liberar la ocupación del receptor (Britschgi, MR et al. 2008).

Podemos por lo tanto concluir que las dos herramientas generadas, CCL2-GFP y CCL19-Fc, pueden ser una ayuda valiosa para la caracterización de las poblaciones celulares que expresan los receptores de estas quimioquinas en el modelo porcino.

En los últimos 20 años se han caracterizado subpoblaciones de monocitos de acuerdo a la expresión de receptores de quimioquinas y sus capacidades migratorias. Los mecanismos y tipos de quimioquinas que intervienen en la migración de los monocitos en humano y en otros modelos como el ratón están

bien establecidos, sin embargo apenas existen datos en la especie porcina. Basándonos en los datos existentes en otros modelos hemos comenzado el estudio del mecanismo de reclutamiento de monocitos porcinos.

Los monocitos humanos se han dividido fundamentalmente en dos subpoblaciones, dependiendo de la expresión de CD14 y CD16 (Ziegler-Heitbrock, HW et al. 1993). Subpoblaciones equivalentes se han descrito también en ratón y rata, basándose en la expresión de Ly-6C/Gr-1 y CD43, respectivamente, y en la expresión de los receptores de quimioquinas CCR2 y CX₃CR1 (Geissmann, F et al. 2003; Sunderkotter, C et al. 2004). Estas subpoblaciones de monocitos juegan papeles funcionales diferentes en los procesos inmunitarios e inflamatorios, presentando distintos patrones de migración y dando lugar a diversos tipos celulares, como macrófagos y DC. (Auffray, C et al. 2009; Geissmann, F et al. 2008; Taylor, PR et al. 2003).

En estudios previos de nuestro grupo se caracterizaron cuatro subpoblaciones de monocitos porcinos, que muestran diferentes niveles de expresión de CD14, SLA-II y CD163 (Chamorro, S et al. 2005). A diferencia de otros investigadores, en nuestros estudios hemos empleado el AcMo Tük4 para identificar el CD14 porcino. Aunque este AcMo se generó originalmente frente al CD14 humano, presenta reactividad cruzada con el CD14 porcino, y a diferencia de otros anticuerpos anti-CD14 porcino que reconocen la totalidad estas células, nos permite distinguir entre monocitos Tük4⁺ y Tük4⁻, que nosotros consideramos CD14⁺ y CD14⁻ (Thacker, E et al. 2001). En trabajos previos hemos propuesto que las poblaciones definidas por la expresión de los marcadores CD14, SLA-II y CD163 representan estadios secuenciales de maduración (Chamorro, S et al. 2005). En este modelo, la subpoblación de monocitos CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻ representaría el estadio más inmaduro y se correspondería con los monocitos “clásicos”, definidos en la especie humana como CD14^{alt}CD16⁻, y la subpoblación CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺ correspondería al estadio más maduro o monocitos “no clásicos”, definidos en la especie humana como CD14⁺CD16⁺. Existen otras dos poblaciones, CD14^{alt}SLA-II⁺CD163⁻ y CD14^{baj}SLA-II⁺CD163⁺, ambas CD14⁺SLA-II⁺, a cuyo conjunto hemos denominado “población intermedia”. La población intermedia se corresponde con un supuesto estado de transición entre las dos poblaciones extremas y tiene sus equivalentes en humano y ratón. En humano esta población intermedia,

identificada como CD14⁺CD16⁺CD64⁺, presenta características únicas y distintas de las poblaciones extremas (Grage-Griebenow, E et al. 2001). En ratón la población intermedia se definió como Ly-6C^{int} (Qu, C et al. 2004; Sunderkotter, C et al. 2004). Al igual que los monocitos humanos CD14⁺CD16⁺, los monocitos porcinos CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺ poseen un aspecto y un fenotipo más parecido al de los macrófagos, con elongaciones celulares y organelas que sugieren actividad fagocítica, produciendo mayores cantidades de TNF- α en respuesta a estímulos inflamatorios y tienen mayor capacidad presentadora de antígeno (Chamorro, S et al. 2005; Chamorro, S et al. 2000). También estos monocitos son más granulares que los CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻, como ocurre con los CD14⁺CD16⁺ en humano (Geissmann, F et al. 2003). Las diferencias fenotípicas se corresponden con la diferencia observada en las fotografías de microscopia electrónica, obtenidas de las dos subpoblaciones aisladas mediante separación magnética.

En esta tesis hemos analizado la expresión de receptores de quimioquinas en las subpoblaciones de monocitos mencionadas. Los análisis por RT-PCR de las poblaciones extremas, CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻ (*inmadura*) y CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺ (*madura*), mostraron que ambas difieren en la expresión de mRNA de CCR2 y CX₃CR1, siendo la población *inmadura* la que expresa niveles detectables del mRNA de CCR2. Por el contrario, la población *madura* expresa el mRNA de CX₃CR1, mientras que no lo hace la población *inmadura*. Todo esto nos indica que, de forma similar que en humano y en ratón, en el cerdo los receptores CX₃CR1 y CCR2 definen dos poblaciones bien diferenciadas, aunque existen discrepancias respecto a CX₃CR1, que en humanos y ratón se expresa en las dos subpoblaciones, si bien en niveles menores en la *inmadura* (Ancuta, P et al. 2003; Geissmann, F et al. 2003; Qu, C et al. 2004).

La expresión de CCR5 y CCR7 es comparable a lo descrito en monocitos humanos y murinos. Nuestros resultados muestran que ambas poblaciones expresan CCR5 sin que se aprecien diferencias significativas entre ellas. Esto coincide con lo descrito por Ancuta para las poblaciones CD14^{alt}CD16⁻ y CD14⁺CD16⁺ humanas (Ancuta, P et al. 2003), aunque otros autores han encontrado niveles de expresión del mRNA de CCR5 ligeramente mayores en la población CD14⁺CD16⁺ humana (Weber, C et al. 2000) y en la Gr-1^{ba} de ratón (Mack, M et al. 2001).

Respecto a la expresión de mRNA de CCR7, no hemos detectado su expresión en ninguna de las dos poblaciones extremas, pero sí en la población total de monocitos, lo que nos sugería que tiene que expresarse en la población intermedia.

En relación a la expresión de los transcritos de CXCR4, se encontraron diferencias respecto a lo que ocurre en el humano, expresándose en el cerdo en niveles similares o mayores en la población de monocitos *inmaduros* CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻, mientras que en humanos los niveles de expresión de CXCR4 son similares o mayores en los monocitos CD14⁺CD16⁺. (Ancuta, P et al. 2003; Sanchez-Martin, L et al. 2011).

Por último no se observó expresión del mRNA de los receptores CXCR1 ni CCR6 en ninguna de las subpoblaciones de monocitos estudiadas, y solo débilmente en la población total CD172⁺. Esto concuerda con lo descrito en humanos, donde CCR6 se expresa en linfocitos T y B, pero no se encuentra en granulocitos, monocitos, ni eosinófilos (Liao, F et al. 1999). Respecto al CXCR1, la situación es muy parecida a lo descrito en humano, donde se ha detectado una expresión débil de su mRNA en la población total de monocitos (Bonecchi, R et al. 2000; Gouwy, M et al. 2008), pero no en las subpoblaciones CD14^{alt}CD16⁻ y CD14⁺CD16⁺ (Geissmann, F et al. 2003).

Siguiendo en el estudio de los receptores de quimioquinas en las subpoblaciones de monocitos porcinos, utilizamos las quimioquinas recombinantes generadas para estudiar la capacidad migratoria de estas subpoblaciones y caracterizarlas fenotípicamente.

De acuerdo con el análisis de la expresión de los transcritos de receptores de quimioquinas, obtenidos previamente por RT-PCR, los experimentos de migración de los monocitos en respuesta a CCL2, mostraron que la población de monocitos *inmadura* CD14^{alt}SLA-II⁻CD163⁻ y una parte de la población CD14⁺SLA-II⁺CD163⁺, respondían a CCL2-GFP, pero no se observó migración de la población CD14⁻SLA-II⁺CD163⁺. Como aparte de su actividad quimiotáctica, las quimioquinas pueden inducir cambios en el fenotipo y estado de activación de las células (Sanchez-Martin, L et al. 2011), se realizaron una serie de experimentos en los que los monocitos fueron cultivados en recipientes de teflón para impedir su adherencia, en presencia de CCL2-GFP o de su control invertido, para comprobar que la

quimioquina no tenía un efecto significativo sobre la expresión de CD14 ni sobre la de SLA-II.

Hemos analizado la unión de la quimioquina a las diferentes poblaciones de monocitos realizando marcajes triples con la quimioquina recombinante, CD14 y SLA-II. CCL2-GFP se unió específicamente a las poblaciones de monocitos CD14^{alt}SLA-II⁻ y CD14⁺SLA-II⁺, pero no a la población CD14⁻SLA-II⁺. La capacidad de unión de CCL2 a las distintas subpoblaciones de monocitos se correlaciona bien con la expresión de CCR2 determinada por RT-PCR y con los datos de los experimentos de migración, sugiriendo que CCR2 es el principal receptor para esta quimioquina en monocitos porcinos, al igual que ocurre en humano y ratón donde se ha identificado un solo receptor de alta afinidad para CCL2 (Valente, AJ et al. 1991; Yoshimura, T et al. 1990). Aunque CCL2 también se puede unir a los receptores D6 y Duffy/DARC, la expresión de estos receptores en monocitos humanos y murinos es muy baja o indetectable (McKimmie, CS et al. 2008; Pogo, AO et al. 2000; Ransohoff, RM 2009; Zlotnik, A et al. 2006).

Respecto a los experimentos de migración de las poblaciones de monocitos en respuesta a los ligandos de CCR7, de acuerdo a lo que los resultados de RT-PCR sugerían, sólo encontramos respuesta migratoria a CCL19 y a CCL21 en la población intermedia CD14⁺SLA-II⁺. Utilizando la proteína recombinante CCL19-Fc como ligando para analizar por citometría la distribución de CCR7 en las distintas subpoblaciones, confirmamos la expresión restringida de este receptor a la población intermedia. Este patrón de expresión de CCR7 refuerza la particularidad de la población intermedia y pone de manifiesto las similitudes con otras especies, dado que en monocitos humanos la población intermedia presenta expresión de receptores de quimioquinas que no expresan las otras dos poblaciones y en ratón se ha encontrado expresión de CCR7 en la población Ly-6C⁺, pero no en la Ly-6C^{alt} ni en la Ly-6C^{baj} (Ancuta, P et al. 2009; Qu, C et al. 2004).

Aunque en un primer momento nos centramos en la expresión de receptores de quimioquinas en monocitos, la especial relevancia que presenta el receptor CCR7 en la migración de los linfocitos nos hizo interesarnos por su expresión en estas células. Las quimioquinas CCL19 y CCL21, actuando vía CCR7, juegan papeles fundamentales en humano y ratón, en el tráfico de las células T (*naïve* y de

memoria central (T_{CM})) hacia los órganos linfoides secundarios (Cyster, JG 1999; Forster, R et al. 2008; Sallusto, F et al. 1999).

Al igual que con las subpoblaciones de monocitos, se utilizó la capacidad de respuesta a las quimioquinas para estudiar la distribución de receptores específicos en linfocitos porcinos. Cuando se realizaron experimentos de quimiotaxis con CCL21 y CXCL12 y se estudió la respuesta de los linfocitos B ($CD21^+$) y linfocitos T ($CD3^+$), se observó un aumento de la proporción de los linfocitos B en la respuesta a ambas quimioquinas. En estudios en ratón se ha descrito que tanto las células B como las células T sanguíneas responden a estas quimioquinas, siendo el porcentaje de células B que responde a ligandos de CCR7 del 15-30%, lo que se ajusta a nuestros resultados en cerdo (Kim, CH et al. 1998).

Cuando se estudió la respuesta quimiotáctica de las subpoblaciones de células T $CD4^-CD8\alpha^+$, $CD4^+CD8\alpha^-$ o $CD4^+CD8\alpha^+$, a CCL21 y CXCL12, se observó un aumento de la proporción de las poblaciones $CD4^+CD8\alpha^-$ y $CD4^+CD8\alpha^+$ en la población respondedora a las dos quimioquinas. En el modelo de ratón se ha descrito una mayor migración de las células $CD4^+$ en respuesta a CXCL12 y una mayor sensibilidad de estas células a bajas concentraciones de los ligandos de CCR7 (Nanki, T et al. 2000; Ngo, VN et al. 1998). Todo esto puede explicar el ligero aumento de la población $CD4^+$ de las células que responden a las dos quimioquinas estudiadas. Por otra parte otros autores no han observado migración selectiva de células $CD4^+$ o $CD8^+$ a los ligandos de CCR7 murinos (Pilkington, KR et al. 2004).

La respuesta de las células $CD4^+2E3^+$ a los ligandos de CCR7, concuerda con la expresión de los transcritos de CCR7 en estas células descrita previamente por nuestro grupo (Revilla, C et al. 2005a). Además, CCL19 y CCL21 presentan un perfil de quimiotaxis similar, induciendo preferentemente la migración de las células $CD4^+2E3^+$, que habían sido previamente caracterizadas por nuestro grupo como células $CD4$ *naïve* (Revilla, C et al. 2004), y que además está de acuerdo con estudios de migración de células T realizados en el ratón (Ngo, VN et al. 1998).

La obtención de la quimioquina CCL19-Fc, que nos ha permitido detectar la expresión de CCR7 por citometría de flujo, puede ayudar a esclarecer la complejidad de las diferentes subpoblaciones de células T $CD4^+$ porcinas. Para estudiar más en detalle el fenotipo de las células que unen CCL19 se realizaron marcajes con esta quimioquina y los AcMo que reconocen a las principales

subpoblaciones de linfocitos porcinos, CD3, CD21, CD4, CD8 α y CD8 β . Más del 60% de las células CD21⁺ unieron CCL19, lo que es coherente con datos existentes en ratón y humano, donde se ha descrito la expresión de CCR7 en linfocitos B circulantes y su respuesta a los ligandos de CCR7 (Bowman, EP et al. 2000; Kim, JJ et al. 2000; Okada, T et al. 2005; Okada, T et al. 2002). Existe cierto contraste entre los porcentajes de las células CD21 que migran en respuesta a CCL19 y las que unen CCL19-Fc, siendo este último mayor. Sin embargo, en ratón se ha descrito que ambos ligandos de CCR7 (CCL19 y CCL21) deben estar presentes para producir una migración fuerte de los linfocitos B, dado que cada uno por separado produce una respuesta migratoria débil (Ngo, VN et al. 1998). Además, la presencia del receptor de la quimioquina en la superficie celular, no implica necesariamente que éste sea activo e induzca migración (Penna, G et al. 2001).

Por su parte, alrededor del 70% de las células CD4⁺ sanguíneas unieron CCL19, lo que también está de acuerdo con los estudios realizados en ratón, donde la mayoría de las células T sanguíneas son CCR7⁺ (Bjorkdahl, O et al. 2003). La población T CD4⁺ que no une CCL19-Fc podría corresponder a células de memoria efectora. Cuando se realizaron marcajes triples con CCL19-Fc y los AcMo anti-CD4 y 2E3, se observó que CCL19-Fc se une a la mayoría de las células CD4⁺2E3⁺, pero no a las CD4⁺2E3⁻. Esto apoya los resultados obtenidos en la migración de las poblaciones CD4⁺2E3⁺ y CD4⁺2E3⁻ en respuesta a los ligandos de CCR7 y los datos obtenidos anteriormente sobre la expresión de mRNA de CCR7 (Revilla, C et al. 2005a). Estos datos en conjunto confirman la expresión de CCR7 en el modelo porcino en las células T CD4 *naïve* y coinciden con datos previos de humano y ratón, donde se ha relacionado la expresión del receptor CCR7 con la migración de estas células a órganos linfoides secundarios (Bjorkdahl, O et al. 2003; Sallusto, F et al. 1999).

Respecto a las células CD8 α , se observó unión de CCL19-Fc en el 30% aproximadamente de las células CD8 α^{alt} , que se corresponden con las células T citotóxicas y en más del 80% de las CD8 α^{baj} . Esta última es una población heterogénea en la que se incluyen células CD4⁺CD8 α^{baj} que se han asociado con células T cooperadoras de memoria, células NK (CD8 α^{baj}) y una subpoblación de células T $\gamma\delta$ (CD4⁻CD8 α^{baj}). En ratón se ha descrito que la población de células T de memoria llamada de memoria central (T_{CM}) expresa el receptor CCR7 (Sallusto, F et

al. 1999). En humanos se ha descrito la expresión de CCR7 en las células $T\gamma\delta$ $CD8^+$, al igual que en las bovinas, en las que se ha detectado el mRNA de este receptor (Glatzel, A et al. 2002; Wilson, E et al. 2002). Las células NK $CD8\alpha^+CD16^+$ humanas y las $CD8\alpha^+CD16^-$ de mono también expresan el receptor CCR7 (Maghazachi, AA 2010; Reeves, RK et al. 2010). Todo esto podría explicar el alto porcentaje de células $CD8\alpha^+$ que unen CCL19-Fc. Por su parte, aproximadamente la mitad de las células $CD8\beta^+$ citotóxicas unieron CCL19-Fc, lo que podría corresponder con la expresión de CCR7 descrita en ratón por otros autores en las células T $CD8$ *naïve*, pero no en las $CD8$ efectoras (Unsoeld, H et al. 2004). Cuando intentamos acotar más esta población, mediante el marcaje de CD45RA, observamos que CCL19-Fc se une a un mayor porcentaje de células $CD8\beta^+ CD45RA^+$ que de $CD8\beta^+CD45RA^-$. Todo ello refleja una heterogeneidad en las células T citotóxicas, que estaría relacionada al menos en parte, con su capacidad de migración. Estos datos se asemejan a lo descrito en humanos, donde se han identificado cuatro subpoblaciones de células $CD8^+$ de acuerdo con su expresión de CCR7 y de CD45RA, con diferentes características funcionales: $CD45RA^+CCR7^+$ (células T *naïve*), $CD45RA^-CCR7^+$ (células de memoria central), $CD45RA^-CCR7^-$ (células de memoria efectora) y $CD45RA^+CCR7^-$ (células de memoria a largo plazo) (Faint, JM et al. 2001; Fukada, K et al. 2002; Matteucci, E et al. 2011; Sallusto, F et al. 1999). En este modelo, las células de memoria a largo plazo recuperarían la expresión de CD45RA. Algunos experimentos en rata también apoyan que las células T $CD8^+$ primadas pueden revertir de $CD45RA^-$ a $CD45RA^+$ (Bell, EB et al. 1990).

En la sanidad animal, al igual que en la humana, la obtención de vacunas efectivas sigue siendo la mejor opción para conseguir el control y la prevención de las enfermedades infectocontagiosas. Por ello, el desarrollo de estrategias de vacunación más seguras y eficaces es un área de investigación muy activa. Entre otras cosas, se está considerando la utilización de nuevos adyuvantes que faciliten la inducción y el aumento de la respuesta inmune de las vacunas DNA. Uno de los criterios que se considera en la selección de un adyuvante, es la capacidad de reclutamiento de APC al lugar de inoculación de la vacuna, ya que se ha descrito que el número de APC presentes en el sitio de inyección es un factor limitante para

su eficacia. En este sentido, las quimioquinas son candidatas idóneas para ser utilizadas como adyuvantes, dado que algunas de ellas ejercen acción quimiotáctica sobre las APC y además participan en su activación (Ruffini, PA et al. 2010). Así, hemos considerado de interés evaluar el potencial de la quimioquina CCL2 como adyuvante en un modelo de inmunización con DNA. Ya se ha comentado que CCL2 se caracterizó en principio en humano como un potente factor quimiotáctico de monocitos, que actuaba a través de su receptor CCR2 (Van Coillie, E et al. 1999). CCL2 ejerce también su efecto quimiotáctico sobre las DCs, sobre todo en las primeras fases del reclutamiento (Crawley, A et al. 2003; Dawson, HD et al. 2005). Por su parte los monocitos son células que, además de actuar directamente como APCs, son una fuente importante de DC, tanto *in vitro* como *in vivo* (Chamorro, S et al. 2000; Chamorro, S et al. 2004; Leon, B et al. 2007; Randolph, GJ et al. 2008). Ya hemos demostrado que en cerdo las poblaciones de monocitos que expresan CCR2 son CD14^{alt}SLAII⁻CD163⁻, que presentan características similares a los monocitos *clásicos*, descritos en humano y ratón (Chamorro, S et al. 2005), y CD14^{alt}SLA-II⁺CD163⁻, que correspondería a la que hemos denominado *población intermedia*. En ratón y en humano se ha demostrado que estas dos poblaciones pueden ser reclutadas en focos inflamatorios de manera dependiente de CCL2 (Ancuta, P et al. 2009; Auffray, C et al. 2009; Peters, W et al. 2004).

Para valorar la eficacia de CCL2, *in vivo*, como adyuvante de una vacuna DNA, se inmunizó un grupo de cerdos con el plásmido que codifica la proteína N del virus del SRRP (spORF7) junto con el plásmido que codifica la construcción CCL2-GFP (pCCL2), además de una serie de grupos inmunizados con distintos controles, y se analizaron las respuestas producidas en estos animales. Tras tres dosis de plásmido, los animales recibieron una dosis de vacuna inactivada frente al virus del SRRP (pseudodesafío). Aunque hubiera sido deseable poder realizar un desafío con virus vivo, esto no se pudo llevar a cabo debido a las restricciones para el uso de material infeccioso en nuestras instalaciones. La vía intramuscular, elegida para la inmunización, ha sido descrita como una forma efectiva para la expresión de genes y para la estimulación de la respuesta inmune (Ulmer, JB et al. 1993; Wolff, JA et al. 1990).

Tal como se ha descrito, no se detectaron anticuerpos durante las primeras semanas pero, tras el pseudodesafío, los cerdos inmunizados con ambos

plásmidos, spORF7 + pCCL2, produjeron niveles de anticuerpos específicos frente a la proteína N, significativamente mayores que los cerdos inmunizados con el plásmido vacío. Así, aunque la vacunación no indujo niveles detectables de anticuerpos por si misma, si primó eficientemente al sistema inmune para que se produjera una diferencia significativa tras la vacunación. Cuando comparamos los resultados obtenidos con el grupo que recibió solo el spORF7, el grupo al que se coadministró pCCL2 mostraba un mejor comportamiento, tanto en la cantidad de anticuerpos, número de animales positivos y rapidez de la respuesta, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al reducido número de animales de la muestra y a la dispersión de los datos.

En el cerdo, la producción de anticuerpos de isotipos IgG1 e IgG2 se ha asociado con la inducción de respuestas Th2 y Th1, respectivamente (Crawley, A et al. 2003; Dawson, HD et al. 2005). Las diferencias que se observaron en los isotipos de los anticuerpos producidos entre los grupos de animales no fueron estadísticamente significativas, debido a la dispersión de los datos. A pesar de ello hubo más animales que presentaron anticuerpos de isotipo IgG2 que IgG1, lo que correspondería con una respuesta Th1, descrita por otros grupos cuando utilizaron CCL2 en la vacunación (Frauenschu, A et al. 2004).

En cuanto a la respuesta celular, no se detectó proliferación antígeno-específica en las PBMC procedentes de estos animales. No obstante, el hecho de que se hayan detectado anticuerpos específicos en los sueros refleja que ha habido también una respuesta celular, aunque su magnitud haya sido insuficiente para ser detectada en nuestro ensayo de proliferación. Es posible que la baja frecuencia de precursores circulantes en sangre en el momento del ensayo junto con la baja sensibilidad del mismo hayan sido las causas de este resultado negativo.

Podríamos especular qué habría ocurrido si los animales hubieran sido probados con un virus infectivo. Probablemente los niveles de proliferación y de producción de anticuerpos habrían sido mayores, como se ha observado en otros estudios realizados en este modelo vírico (Rompato, G et al. 2006). En este sentido, un estudio previo describe un aumento de hasta 100 veces de la cantidad de anticuerpos específicos en cerdos preinmunizados con plásmidos, pero sin quimioquinas, tras ser inoculados con el virus vivo del SRRP (Barfoed, AM et al. 2004).

Los experimentos de co-inmunización con plásmidos de quimioquinas han obtenido resultados muy dispares. En nuestro caso hemos detectado respuesta humoral, pero no hemos sido capaces de detectar respuesta celular, mientras que en un modelo de ratón en el que se utilizó también el plásmido de CCL2 junto con otro que codificaba un antígeno del virus del SIDA, no se observó mejora de la respuesta humoral respecto a la inmunización sin el plásmido CCL2, aunque sí un aumento de las células productoras de IFN- γ (Frauenschuh, A et al. 2004). Una de las razones por las que la respuesta detectada fue débil puede ser la dosis administrada de plásmidos. Por ejemplo, en un modelo de co-inmunización realizado en el ratón utilizando la quimioquina CCL27, se consiguió aumentar la respuesta humoral a un antígeno del virus del SIDA inmunizando a los ratones con 3 dosis de 100 μ g del plásmido de la quimioquina. Sin embargo cuando el ensayo se realizó con animales mayores (monos *Macaca mulatta*), a los que se les administró 1 mg del plásmido de la quimioquina, no se observó diferencia en la respuesta de anticuerpos respecto al grupo inmunizado sólo con la vacuna. Si tenemos estos datos en cuenta, considerando el tamaño del animal de estudio en nuestro caso, la administración de 500 μ g de plásmido es probablemente una dosis pequeña (Kutzler, MA et al. 2010). Otro aspecto a considerar es el hecho de que la co-inyección al mismo tiempo de la quimioquina y el antígeno puede no ser ideal, necesitando la quimioquina cierto tiempo para expresarse en los niveles adecuados y actuar. Si esto fuera así, es posible que la inyección de las quimioquinas antes de la inyección del antígeno produzca niveles más altos de anticuerpos (Ferrone, CR et al. 2006).

La capacidad de primar la respuesta que hemos observado, hace posible su utilización en pautas de inmunización heteróloga DNA + vacuna inactivada (u otra formulación vacunal). Numerosos estudios han demostrado el efecto positivo de la inmunización heteróloga en la efectividad de vacunas ya existentes (Lu, S 2009). Por ejemplo, la preinmunización con DNA incrementó los niveles de anticuerpos en ratones a los que luego se les administró la vacuna frente a la rabia (Biswas, S et al. 2001). Así mismo, la preinmunización con DNA mejoró la respuesta humoral de ratones vacunados con la proteína de superficie de la hepatitis B (Xiao-wen, H et al. 2005). En un modelo animal de infección por gripe, también se demostró que la inmunización con DNA junto con una única

inmunización con la vacuna inactivada de la gripe (*trivalent influenza vaccine*, TIV) producía mejores resultados que dos inmunizaciones homólogas con DNA, o sólo la vacuna (Wang, S et al. 2008).

La respuesta observada podría optimizarse en futuros experimentos, modificando algunos aspectos. Un factor que puede mejorar la eficacia quimiotáctica de las quimioquinas *in vivo* es la dimerización. La dimerización de las quimioquinas es importante para que se produzca la unión a su receptor, la internalización del mismo y la respuesta funcional (Fredriksen, AB et al. 2007). Una alternativa interesante para futuros experimentos sería fusionar la quimioquina CCL2 a la porción Fc de una inmunoglobulina, lo que no podría favorecer la dimerización (Ferrone, CR et al. 2006). Además, la unión de las quimioquinas con el Fc puede aumentar su estabilidad *in vivo* (Barouch, DH et al. 2004; Mellado, M et al. 2001). Otro posible abordaje con CCL2, que ha sido utilizado por otros autores, es la unión física del antígeno con la quimioquina (Biragyn, A et al. 2002).

Los resultados obtenidos sugieren la capacidad del CCL2 para mejorar la respuesta. Es un resultado prometedor, aunque no definitivo, para la generación de adyuvantes que nos permitan aumentar la inmunogenicidad de las vacunas DNA de manera simple. Este abordaje, una vez puesto a punto en todos sus detalles, podría aplicarse a otros antígenos y a otros modelos para mejorar la respuesta inmune, tanto en el aspecto celular como en el humoral. Las vacunas que se están utilizando actualmente en el SRRP requieren frecuentemente varias reinmunizaciones, lo que demuestra su baja eficacia (Lu, S 2009). Nuestros resultados apuntan a un camino en el que tal vez se pueda reducir el número de dosis de vacunación, contando además con un menor costo y una mayor estabilidad.

CONCLUSIONES

1. Se han generado líneas estables de células CHO que expresan moléculas quiméricas de las quimioquinas porcinas CCL2, CCL19 y CCL21, fusionadas a GFP o al fragmento Fc de IgG1 humana. Estas proteínas recombinantes tienen actividad quimiotáctica.
2. La molécula CCL19-Fc puede ser purificada y concentrada en un solo paso a partir de sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de afinidad en columnas con anticuerpos monovalentes de llama frente a IgG humana. La proteína así purificada conserva su actividad quimiotáctica y puede ser utilizada como ligando en el análisis por citometría de flujo para detectar la expresión de receptores específicos
3. La unión de CCL19-Fc a las células de una línea CHO transfectada que expresa en su superficie el ortólogo porcino del receptor CCR7 confirma la identidad de este receptor.
4. Las subpoblaciones de monocitos definidas de acuerdo con la expresión de CD14, SLA-II y CD163, difieren en la expresión de transcritos de receptores de quimioquinas. La población $CD14^{alt}SLA-II^{-}CD163^{-}$ expresa CCR2 pero no CX₃CR1, mientras que la población $CD14^{-}SLA-II^{+}CD163^{+}$ expresa CX₃CR1 pero no CCR2.
5. La quimioquina recombinante CCL2-GFP induce respuesta quimiotáctica y marca, de forma detectable por citometría de flujo, las subpoblaciones de monocitos porcos $CD14^{alt}SLA-II^{-}CD163^{-}$ y $CD14^{+}SLA-II^{+}CD163^{+}$.
6. Las quimioquinas porcinas CCL19 y CCL21 inducen la migración de la población de monocitos porcos $CD14^{+}SLA-II^{+}$, cuya expresión del receptor CCR7 se había inferido de los análisis de los transcritos de receptores de quimioquinas. Además se puede detectar la unión de la proteína recombinante CCL19-Fc a esta población intermedia mediante citometría.

7. El marcaje con CCL19-Fc, permite discriminar distintas subpoblaciones de linfocitos T porcinos, identificando a la mayoría de las células $CD4^{+}2E3^{+}$ (fenotipo asociado a células T *naïve*), a más del 50% de las células $CD8\beta^{+}CD45RA^{+}$ que podrían corresponder a células *naïve* y a un pequeño porcentaje de células $CD8\beta^{+}CD45RA^{-}$, que podrían corresponder a células T citotóxicas de memoria.

8. La co-inmunización de cerdos con plásmidos que codifican CCL2 y la proteína N del virus del SRRP, seguido de la inmunización con una vacuna inactivada, generó una respuesta humoral específica más intensa y temprana que la obtenida en los cerdos inmunizados únicamente con el plásmido que codifica la proteína N o sólo con la vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K. y L. A. H. (2006). "Basic immunology. Functions and disorders of the immune system." Elsevier 2Ed
- Abboud, C. N., J. L. Liesveld, et al. (1995). "Granulopoiesis and monocytopenia." In Hematology." eds. R Hoffman. New York: Churchill Livingstone: 255-274.
- Ajuebor, M. N., R. J. Flower, et al. (1998). "Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model." *J Leukoc Biol* 63(1): 108-16.
- Alvarez, B., C. Revilla, et al. (2006). "Molecular cloning, characterization and tissue expression of porcine Toll-like receptor 4." *Dev Comp Immunol* 30(4): 345-55.
- Alvarez, B., C. Sanchez, et al. (2000). "A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1." *Tissue Antigens* 55(4): 342-51.
- Allen, S. J., S. E. Crowny T. M. Handel (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." *Annu Rev Immunol* 25: 787-820.
- Ancuta, P., K. Y. Liu, et al. (2009). "Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets." *BMC Genomics* 10: 403.
- Ancuta, P., R. Rao, et al. (2003). "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." *J Exp Med* 197(12): 1701-7.
- Ansari, I. H., B. Kwon, et al. (2006). "Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies." *J Virol* 80(8): 3994-4004.
- Ansel, K. M., V. N. Ngo, et al. (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." *Nature* 406(6793): 309-14.
- Auffray, C., D. Fogg, et al. (2007). "Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior." *Science* 317(5838): 666-70.
- Auffray, C., M. H. Siewekey F. Geissmann (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 27: 669-92.
- Bacon, K. M., B. A. Baggiolini, et al. (2002). "Chemokine/chemokine receptor nomenclature." *J Interferon Cytokine Res* 22(10): 1067-8.
- Bacon, K. B., B. A. Premack, et al. (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." *Science* 269(5231): 1727-30.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Barfoed, A. M., M. Blixenkrone-Moller, et al. (2004). "DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus." *Vaccine* 22(27-28): 3628-41.
- Barouch, D. H., N. L. Letviny R. A. Seder (2004). "The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses." *Immunol Rev* 202: 266-74.
- Bartoli, C., M. Civatte, et al. (2001). "CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies." *Acta Neuropathol* 102(4): 385-92.
- Bautista, E. M. y T. W. Molitor (1997). "Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine." *Viral Immunol* 10(2): 83-94.
- Bautista, E. M., P. Suarezzy T. W. Molitor (1999). "T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *Arch Virol* 144(1): 117-34.
- Bell, E. B. y S. M. Sparshott (1990). "Interconversion of CD45R subsets of CD4 T cells in vivo." *Nature* 348(6297): 163-6.
- Beutler, B., Z. Jiang, et al. (2006). "Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large." *Annu Rev Immunol* 24: 353-89.
- Biragyn, A., I. M. Belyakov, et al. (2002). "DNA vaccines encoding human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 fusions with proinflammatory chemoattractants induce systemic and mucosal immune responses." *Blood* 100(4): 1153-9.
- Biswas, S., G. S. Reddy, et al. (2001). "Preexposure efficacy of a novel combination DNA and inactivated rabies virus vaccine." *Hum Gene Ther* 12(15): 1917-22.

- Bjorkdahl, O., K. A. Barber, et al. (2003). "Characterization of CC-chemokine receptor 7 expression on murine T cells in lymphoid tissues." *Immunology* 110(2): 170-9.
- Blecha, F.T. Kielian, et al. (1994). "Workshop studies on monoclonal antibodies reactive against porcine myeloid cells." *Vet Immunol Immunopathol* 43(1-3): 269-72.
- Bleul, C. C., R. C. Fuhlbrigge, et al. (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." *J Exp Med* 184(3): 1101-9.
- Bonecchi, R..F. Facchetti, et al. (2000). "Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes." *J Immunol* 164(7): 3862-9.
- Bowman, E. P., J. J. Campbell, et al. (2000). "Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation." *J Exp Med* 191(8): 1303-18.
- Britschgi, M. R., A. Link, et al. (2008). "Dynamic modulation of CCR7 expression and function on naive T lymphocytes in vivo." *J Immunol* 181(11): 7681-8.
- Burns, J. M..B. C. Summers, et al. (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med* 203(9): 2201-13.
- Busillo, J. M.y J. L. Benovic (2007). "Regulation of CXCR4 signaling." *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 952-63.
- Calvert, J. G., D. E. Slade, et al. (2007). "CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses." *J Virol* 81(14): 7371-9.
- Cavanagh, D. (1997). "Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae." *Arch Virol* 142(3): 629-33.
- Cleveland, M. G., J. D. Gorham, et al. (1996). "Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway." *Infect Immun* 64(6): 1906-12.
- Colamussi, M. L., P. Secchiero, et al. (2001). "Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) induces CD4+ T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway." *J Leukoc Biol* 69(2): 263-70.
- Comerford, I., R. J. Nibbs, et al. (2010). "The atypical chemokine receptor CCX-CKR scavenges homeostatic chemokines in circulation and tissues and suppresses Th17 responses." *Blood* 116(20): 4130-40.
- Conzelmann, K. K., N. Visser, et al. (1993). "Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group." *Virology* 193(1): 329-39.
- Costers, S., M. Vanhee, et al. (2010). "GP4-specific neutralizing antibodies might be a driving force in PRRSV evolution." *Virus Res* 154(1-2): 104-13.
- Crawley, A.y B. N. Wilkie (2003). "Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics." *Vaccine* 21(21-22): 2911-22.
- Cruz, J. L., S. Zuniga, et al. (2010). "Vectored vaccines to protect against PRRSV." *Virus Res* 154(1-2): 150-60.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." *Science* 286(5447): 2098-102.
- Czuprynski, C. J., J. F. Brown, et al. (1994). "Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection." *J Immunol* 152(4): 1836-46.
- Chamorro, S., C. Revilla, et al. (2005). "Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation." *Immunology* 114(1): 63-71.
- Chamorro, S., C. Revilla, et al. (2000). "Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig." *Immunobiology* 202(1): 82-93.
- Chamorro, S., C. Revilla, et al. (2004). "In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells." *Immunobiology* 209(1-2): 57-65.
- Chareerntantanakul, W., R. Platt, et al. (2006). "Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *Vet Immunol Immunopathol* 109(1-2): 99-115.

- Chen, G., O. Zhuchenkoy A. Kuspa (2007). "Immune-like phagocyte activity in the social amoeba." *Science* 317(5838): 678-81.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Dawson, H. D. E. Beshah, et al. (2005). "Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*." *Infect Immun* 73(2): 1116-28.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." *J Interferon Cytokine Res* 29(6): 313-26.
- Dhama, K., M. Mahendran, et al. (2008). "DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives." *Vet Res Commun* 32(5): 341-56.
- Diaz, I., L. Darwich, et al. (2005). "Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *J Gen Virol* 86(Pt 7): 1943-51.
- Dominguez, J. A. Ezquerro, et al. (1998). "Porcine myelomonocytic markers: summary of the Second International Swine CD Workshop." *Vet Immunol Immunopathol* 60(3-4): 329-41.
- Dudziak, D. A. O. Kamphorst, et al. (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." *Science* 315(5808): 107-11.
- Duong, M., N. Ouellet, et al. (1998). "Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice." *J Infect Dis* 178(5): 1472-82.
- Eash, K. J., J. M. Means, et al. (2009). "CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions." *Blood* 113(19): 4711-9.
- Ezquerro, A., C. Revilla, et al. (2009). "Porcine myelomonocytic markers and cell populations." *Dev Comp Immunol* 33(3): 284-98.
- Fabrick, B. O., C. D. Dijkstray T. K. van den Berg (2005). "The macrophage scavenger receptor CD163." *Immunobiology* 210(2-4): 153-60.
- Facci, M. R., G. Auray, et al. (2010). "A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs." *Immunology* 129(3): 396-405.
- Faint, J. M. N. E. Annels, et al. (2001). "Memory T cells constitute a subset of the human CD8+CD45RA+ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics." *J Immunol* 167(1): 212-20.
- Fang, F. C. (2004). "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." *Nat Rev Microbiol* 2(10): 820-32.
- Ferrone, C. R. M. A. Perales, et al. (2006). "Adjuvanticity of plasmid DNA encoding cytokines fused to immunoglobulin Fc domains." *Clin Cancer Res* 12(18): 5511-9.
- Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz A. Rot (2008). "CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance." *Nat Rev Immunol* 8(5): 362-71.
- Frauenschuh, A., A. L. DeVico, et al. (2004). "Differential polarization of immune responses by co-administration of antigens with chemokines." *Vaccine* 23(4): 546-54.
- Fredriksen, A. B. y B. Bogen (2007). "Chemokine-idiotype fusion DNA vaccines are potentiated by bivalency and xenogeneic sequences." *Blood* 110(6): 1797-805.
- Fukada, K., Y. Sobao, et al. (2002). "Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8+ T cells." *J Immunol* 168(5): 2225-32.
- Garcia, S., J. DiSantoy B. Stockinger (1999). "Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation." *Immunity* 11(2): 163-71.
- Gautier, E. L., C. Jakubzicky G. J. Randolph (2009). "Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(10): 1412-8.

- Geissmann, F., C. Auffray, et al. (2008). "Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses." *Immunol Cell Biol* 86(5): 398-408.
- Geissmann, F., S. Jung, D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." *Immunity* 19(1): 71-82.
- Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* 327(5966): 656-61.
- Gerner, W., T. Kasery, A. Saalmüller (2009). "Porcine T lymphocytes and NK cells--an update." *Dev Comp Immunol* 33(3): 310-20.
- Giordano, D., D. M. Magaletti, et al. (2003). "Cyclic nucleotides promote monocyte differentiation toward a DC-SIGN⁺ (CD209) intermediate cell and impair differentiation into dendritic cells." *J Immunol* 171(12): 6421-30.
- Glatzel, A., D. Wesch, et al. (2002). "Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells." *J Immunol* 168(10): 4920-9.
- González, S., C. Mendoza, et al. (1990). "Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation." *Vet Immunol Immunopathol* 26(1): 71-80.
- Gordon, S., P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* 5(12): 953-64.
- Gouwy, M., S. Struyf, et al. (2008). "Synergy between coproduced CC and CXC chemokines in monocyte chemotaxis through receptor-mediated events." *Mol Pharmacol* 74(2): 485-95.
- Goyal, S. M. (1993). "Porcine reproductive and respiratory syndrome." *J Vet Diagn Invest* 5(4): 656-64.
- Grage-Griebenow, E., R. Zawatzky, et al. (2001). "Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes." *Eur J Immunol* 31(1): 48-56.
- Graversen, J. H., M. Madsen, S. K. Moestrup (2002). "CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma." *Int J Biochem Cell Biol* 34(4): 309-14.
- Green, S. R., K. H. Han, et al. (2006). "The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK." *J Immunol* 176(12): 7412-20.
- Gregory, C. D. (2000). "CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system." *Curr Opin Immunol* 12(1): 27-34.
- Gutierrez, J., L. Kremer, et al. (2004). "Analysis of post-translational CCR8 modifications and their influence on receptor activity." *J Biol Chem* 279(15): 14726-33.
- Heinzel, K., C. Benzy, C. C. Bleul (2007). "A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(20): 8421-6.
- Hesselgesser, J., M. Liang, et al. (1998). "Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity." *J Immunol* 160(2): 877-83.
- Hoogewerf, A. J., G. S. Kuschert, et al. (1997). "Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines." *Biochemistry* 36(44): 13570-8.
- Hosang, K., I. Knoke, et al. (1994). "Porcine luteal cells express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): analysis by polymerase chain reaction and cDNA cloning." *Biochem Biophys Res Commun* 199(2): 962-8.
- Huang, Y. W., X. J. Meng, et al. (2010). "Novel strategies and approaches to develop the next generation of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)." *Virus Res* 154(1-2): 141-9.
- Ilerino, F. L., M. S. Powell, et al. (1993). "Recombinant soluble human Fc gamma RII: production, characterization, and inhibition of the Arthus reaction." *J Exp Med* 178(5): 1617-28.

- Imhof, B. A. y M. Aurrand-Lions (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." *Nat Rev Immunol* 4(6): 432-44.
- Kamei, M. y C. V. Carman (2010). "New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes." *Curr Opin Hematol* 17(1): 43-52.
- Karin, N. (2010). "The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 α) in the regulation of immunity during health and disease." *J Leukoc Biol* 88(3): 463-73.
- Kim, C. H., L. M. Pelus, et al. (1998). "Macrophage-inflammatory protein-3 beta/EBI1-ligand chemokine/CK beta-11, a CC chemokine, is a chemoattractant with a specificity for macrophage progenitors among myeloid progenitor cells." *J Immunol* 161(5): 2580-5.
- Kim, J. J., J. S. Yang, et al. (2000). "Chemokine gene adjuvants can modulate immune responses induced by DNA vaccines." *J Interferon Cytokine Res* 20(5): 487-98.
- Kohler, G. y C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* 256(5517): 495-7.
- Kohout, T. A., S. L. Nicholas, et al. (2004). "Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7." *J Biol Chem* 279(22): 23214-22.
- Kornfeld, R. y S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* 54: 631-64.
- Kristiansen, M., J. H. Graversen, et al. (2001). "Identification of the haemoglobin scavenger receptor." *Nature* 409(6817): 198-201.
- Kutzler, M. A., K. A. Kraynyak, et al. (2010). "Plasmids encoding the mucosal chemokines CCL27 and CCL28 are effective adjuvants in eliciting antigen-specific immunity in vivo." *Gene Ther* 17(1): 72-82.
- Kutzler, M. A. y D. B. Weiner (2004). "Developing DNA vaccines that call to dendritic cells." *J Clin Invest* 114(9): 1241-4.
- Labarque, G., K. V. Reeth, et al. (2004). "Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy." *Vaccine* 22(31-32): 4183-90.
- Le, Y., Y. Zhou, et al. (2004). "Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease." *Cell Mol Immunol* 1(2): 95-104.
- Ledger, T. N., P. Pinton, et al. (2004). "Development of a macroarray to specifically analyze immunological gene expression in swine." *Clin Diagn Lab Immunol* 11(4): 691-8.
- Lee, J., K. Choi, et al. (2004). "Gammadelta T cells in immunity induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination." *Infect Immun* 72(3): 1504-11.
- Leon, B., M. Lopez-Bravoy C. Ardavin (2007). "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*." *Immunity* 26(4): 519-31.
- Liao, F., R. L. Rabin, et al. (1999). "CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 α ." *J Immunol* 162(1): 186-94.
- Libby, P., M. Nahrendorf, et al. (2008). "Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal." *Circulation* 117(25): 3168-70.
- Lo, K. M., Y. Sudo, et al. (1998). "High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells." *Protein Eng* 11(6): 495-500.
- Lopez Fuertes, L., N. Domenech, et al. (1999). "Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection." *Virus Res* 64(1): 33-42.
- Lowman, H. B., W. J. Fairbrother, et al. (1997). "Monomeric variants of IL-8: effects of side chain substitutions and solution conditions upon dimer formation." *Protein Sci* 6(3): 598-608.
- Lu, B., B. J. Rutledge, et al. (1998). "Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice." *J Exp Med* 187(4): 601-8.

- Lu, S. (2009). "Heterologous prime-boost vaccination." *Curr Opin Immunol* 21(3): 346-51.
- Lu, Y.-K. Q. Xin, et al. (1999). "Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) expression plasmid enhances DNA vaccine-induced immune response against HIV-1." *Clin Exp Immunol* 115(2): 335-41.
- Luster, A. D. (2002). "The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity." *Curr Opin Immunol* 14(1): 129-35.
- Luther, S. A., A. Bidgol, et al. (2002). "Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis." *J Immunol* 169(1): 424-33.
- Mack, M.-J. Cihak, et al. (2001). "Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice." *J Immunol* 166(7): 4697-704.
- Maghazachi, A. A. (2010). "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." *Curr Top Microbiol Immunol* 341: 37-58.
- Mardassi, H., R. Athanassious, et al. (1994). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome." *Can J Vet Res* 58(1): 55-64.
- Massberg, S.-P. Schaerli, et al. (2007). "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues." *Cell* 131(5): 994-1008.
- Mateu, E. y I. Diaz (2008). "The challenge of PRRS immunology." *Vet J* 177(3): 345-51.
- Matteucci, E., M. Ghimenti, et al. (2011). "Altered Proportions of Naive, Central Memory and Terminally Differentiated Central Memory Subsets among CD4(+) and CD8 (+) T Cells Expressing CD26 in Patients with Type 1 Diabetes." *J Clin Immunol*.
- McKee, A. S., M. K. MacLeod, et al. (2010). "Immune mechanisms of protection: can adjuvants rise to the challenge?" *BMC Biol* 8: 37.
- McKimmie, C. S.-A. R. Fraser, et al. (2008). "Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1." *J Immunol* 181(5): 3353-63.
- Meier, W. A., J. Galeota, et al. (2003). "Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination." *Virology* 309(1): 18-31.
- Meier, W. A., R. J. Husmann, et al. (2004). "Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *Vet Immunol Immunopathol* 102(3): 299-314.
- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." *Embo J* 20(10): 2497-507.
- Mellman, I., R. M. Steinmany m (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." *Cell* 106(3): 255-8.
- Meng, X. J. (2000). "Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development." *Vet Microbiol* 74(4): 309-29.
- Metcalf, D. y A. W. Burgess (1982). "Clonal analysis of progenitor cell commitment of granulocyte or macrophage production." *J Cell Physiol* 111(3): 275-83.
- Meurens, F., M. Berri, et al. (2009). "Early immune response following *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops." *Vet Res* 40(1): 5.
- Moulin, M., C. Deleu, et al. (2002). "High-performance liquid chromatography determination of pipelicolic acid after precolumn ninhydrin derivatization using domestic microwave." *Anal Biochem* 308(2): 320-7.
- Murphy, P. M. (1994). "The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors." *Annu Rev Immunol* 12: 593-633.
- Nanki, T. y P. E. Lipsky (2000). "Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation." *J Immunol* 164(10): 5010-4.

- Nelson, E. A., J. Christopher-Hennings D. A. Benfield (1994). "Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus." *J Vet Diagn Invest* 6(4): 410-5.
- Neumann, E. J., J. B. Kliebenstein, et al. (2005). "Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States." *J Am Vet Med Assoc* 227(3): 385-92.
- Ngo, V. N., H. L. Tangy J. G. Cyster (1998). "Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells." *J Exp Med* 188(1): 181-91.
- Nielsen, H. S., M. B. Oleksiewicz, et al. (2001). "Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations." *J Gen Virol* 82(Pt 6): 1263-72.
- Nilubol, D., K. B. Platt, et al. (2004). "The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs." *Vet Microbiol* 102(1-2): 11-8.
- Nygard, A. B., C. B. Jorgensen, et al. (2007). "Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR." *BMC Mol Biol* 8: 67.
- Okada, T., M. J. Miller, et al. (2005). "Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells." *PLoS Biol* 3(6): e150.
- Okada, T., V. N. Ngo, et al. (2002). "Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches." *J Exp Med* 196(1): 65-75.
- Olson, K. R., J. R. McIntoshy J. B. Olmsted (1995). "Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras." *J Cell Biol* 130(3): 639-50.
- Ondrackova, P., K. Nechvatalova, et al. (2010). "Porcine mononuclear phagocyte subpopulations in the lung, blood and bone marrow: dynamics during inflammation induced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*." *Vet Res* 41(5): 64.
- Ott, T. R., A. Pahuja, et al. (2004). "Identification of CC chemokine receptor 7 residues important for receptor activation." *J Biol Chem* 279(41): 42383-92.
- Pablos, J. L., A. Amara, et al. (1999). "Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin." *Am J Pathol* 155(5): 1577-86.
- Palframan, R. T., S. Jung, et al. (2001). "Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues." *J Exp Med* 194(9): 1361-73.
- Patrussi, L., y C. T. Baldari (2008). "Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells." *Immunol Lett* 115(2): 75-82.
- Peled, A., V. Grabovsky, et al. (1999). "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." *J Clin Invest* 104(9): 1199-211.
- Penna, G., S. Sozzaniy L. Adorini (2001). "Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* 167(4): 1862-6.
- Pérez C, Ortuño E, et al. (2008). "Cloning and expression of porcine CD163:its use for characterization of monoclonal antibodies to porcine CD163 and development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids." *spanish Journal of agricultural research*(6): 59-72.
- Pesch, S., C. Meyery V. F. Ohlinger (2005). "New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)." *Vet Microbiol* 107(1-2): 31-48.
- Peters, W., J. G. Cyster, et al. (2004). "CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *J Immunol* 172(12): 7647-53.
- Peters, W., M. Dupuisy I. F. Charo (2000). "A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses." *J Immunol* 165(12): 7072-7.

- Petersen, C. B., A. B. Nygard, et al. (2007). "Cloning, characterization and mapping of porcine CD14 reveals a high conservation of mammalian CD14 structure, expression and locus organization." *Dev Comp Immunol* 31(7): 729-37.
- Pilkington, K. R., I. Clark-Lewis S. R. McColl (2004). "Inhibition of generation of cytotoxic T lymphocyte activity by a CCL19/macrophage inflammatory protein (MIP)-3beta antagonist." *J Biol Chem* 279(39): 40276-82.
- Piras, F., S. Bollard, et al. (2005). "Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine." *Viral Immunol* 18(2): 381-9.
- Pirzadeh, B. y S. Dea (1997). "Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants." *J Gen Virol* 78 (Pt 8): 1867-73.
- Plana-Duran, J., M. Bastons, et al. (1997). "Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *Vet Microbiol* 55(1-4): 361-70.
- Poderoso, T., P. Martinez, et al. (2011). "Delivery of antigen to sialoadhesin or CD163 improves the specific immune response in pigs." *Vaccine* 29(29-30): 4813-20.
- Pogo, A. O. y A. Chaudhuri (2000). "The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor." *Semin Hematol* 37(2): 122-9.
- Qiu, X. T., Y. H. Li, et al. (2007). "Molecular cloning, mapping, and tissue expression of the porcine cluster of differentiation 14 (CD14) gene." *Biochem Genet* 45(5-6): 459-68.
- Qu, C..E. W. Edwards, et al. (2004). "Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes." *J Exp Med* 200(10): 1231-41.
- Randolph, G. J., C. Jakubzicky C. Qu (2008). "Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells." *Curr Opin Immunol* 20(1): 52-60.
- Ransohoff, R. M. (2009). "Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology." *Immunity* 31(5): 711-21.
- Reeves, R. K., J. Gillis, et al. (2010). "CD16- natural killer cells: enrichment in mucosal and secondary lymphoid tissues and altered function during chronic SIV infection." *Blood* 115(22): 4439-46.
- Revilla, C., B. Alvarez, et al. (2005a). "Differential expression of chemokine receptors and CD95 in porcine CD4(+) T cell subsets." *Vet Immunol Immunopathol* 106(3-4): 295-301.
- Revilla, C., T. Poderoso, et al. (2009). "Targeting to porcine sialoadhesin receptor improves antigen presentation to T cells." *Vet Res* 40(3): 14.
- Revilla, C., M. P. Rodriguez-Carreno, et al. (2004). "2E3, a new marker that selectively identifies porcine CD4+ naive T cells." *Dev Comp Immunol* 28(3): 239-50.
- Robben, P. M., M. LaRegina, et al. (2005). "Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis." *J Exp Med* 201(11): 1761-9.
- Rompato, G., E. Ling, et al. (2006). "Positive inductive effect of IL-2 on virus-specific cellular responses elicited by a PRRSV-ORF7 DNA vaccine in swine." *Vet Immunol Immunopathol* 109(1-2): 151-60.
- Rossi, D. y A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* 18: 217-42.
- Ruffini, P. A., G. Grodeland, et al. (2010). "Human chemokine MIP1alpha increases efficiency of targeted DNA fusion vaccines." *Vaccine* 29(2): 191-9.
- Saalmuller, A., W. Hirt, et al. (1994). "Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen." *Immunology* 81(4): 578-83.
- Saalmuller, A., T. Wernery V. Fachinger (2002). "T-helper cells from naive to committed." *Vet Immunol Immunopathol* 87(3-4): 137-45.
- Sadir, R., F. Baleux, et al. (2001). "Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex." *J Biol Chem* 276(11): 8288-96.

- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." *J Exp Med* 182(2): 389-400.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* 401(6754): 708-12.
- Sanchez-Martin, L., A. Estechea, et al. (2011). "The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression." *Blood* 117(1): 88-97.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blancoy J. L. Rodriguez-Fernandez (2006). "The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells." *J Immunol* 176(9): 5153-9.
- Sanchez-Torres, C., P. Gomez-Puertas, et al. (2003). "Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection." *Arch Virol* 148(12): 2307-23.
- Sanz, G., E. Perez, et al. (2007). "Molecular cloning, chromosomal location, and expression analysis of porcine CD14." *Dev Comp Immunol* 31(7): 738-47.
- Sarrias, M. R., J. Gronlund, et al. (2004). "The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system." *Crit Rev Immunol* 24(1): 1-37.
- Sasmono, R. T., D. Oceandy, et al. (2003). "A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse." *Blood* 101(3): 1155-63.
- Savedra, R., Jr., R. L. Delude, et al. (1996). "Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system." *J Immunol* 157(6): 2549-54.
- Serbina, N. V., T. Jia, et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* 26: 421-52.
- Serbina, N. V., E. G. Pamery X (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." *Nat Immunol* 7(3): 311-7.
- Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, et al. (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." *Immunity* 19(1): 59-70.
- Seubert, A., E. Monaci, et al. (2008). "The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells." *J Immunol* 180(8): 5402-12.
- Shinkai, H., Y. Muneta, et al. (2003). "Molecular cloning and chromosomal assignment to SSC12p13-->p11 of swine chemokine receptor CCR7." *Cytogenet Genome Res* 101(2): 155-60.
- Sin, J., J. J. Kim, et al. (2000). "DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4(+) T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo." *J Virol* 74(23): 11173-80.
- Snijder, E. J. y J. J. Meulenberg (1998). "The molecular biology of arteriviruses." *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 961-79.
- Stein, J. V., A. Rot, et al. (2000). "The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules." *J Exp Med* 191(1): 61-76.
- Steinman, R. M. y J. Idoyaga (2010). "Features of the dendritic cell lineage." *Immunol Rev* 234(1): 5-17.
- Strauss-Ayali, D., S. M. Conrady D. M. Mosser (2007). "Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection." *J Leukoc Biol* 82(2): 244-52.
- Summerfield, A. y K. C. McCullough (1997). "Porcine bone marrow myeloid cells: phenotype and adhesion molecule expression." *J Leukoc Biol* 62(2): 176-85.

- Sunderkotter, C., T. Nikolic, et al. (2004). "Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response." *J Immunol* 172(7): 4410-7.
- Suzuki, T., A. Ishii-Watabe, et al. (2010). "Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR." *J Immunol* 184(4): 1968-76.
- Swirski, F. K., M. Nahrendorf, et al. (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." *Science* 325(5940): 612-6.
- Tacke, F., G. J. Randolph (2006). "Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets." *Immunobiology* 211(6-8): 609-18.
- Tada, H., E. Nemoto, et al. (2002). "Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner." *Microbiol Immunol* 46(7): 503-12.
- Takamatsu, H., M. S. Denyer, et al. (2006). "Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection." *Vet Immunol Immunopathol* 112(1-2): 49-61.
- Tarradas, J., B. Alvarez, et al. (2011). "Immunomodulatory effect of swine CCL20 chemokine in DNA vaccination against CSFV." *Vet Immunol Immunopathol* 142(3-4): 243-51.
- Taylor, P., R. S. Gordon (2003). "Monocyte heterogeneity and innate immunity." *Immunity* 19(1): 2-4.
- Teifke, J. P., M. Dauber, et al. (2001). "Detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine alveolar macrophages by two-colour immunofluorescence and in-situ hybridization-immunohistochemistry double labelling." *J Comp Pathol* 124(4): 238-45.
- Thacker, E., A. Summerfield, et al. (2001). "Summary of workshop findings for porcine myelomonocytic markers." *Vet Immunol Immunopathol* 80(1-2): 93-109.
- Triantafyllou, M., K. Triantafyllou (2002). "Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster." *Trends Immunol* 23(6): 301-4.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, et al. (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." *Science* 259(5102): 1745-9.
- Unsoeld, H., S. Krautwald, et al. (2002). "Cutting edge: CCR7+ and CCR7- memory T cells do not differ in immediate effector cell function." *J Immunol* 169(2): 638-41.
- Unsoeld, H., D. Voehringer, et al. (2004). "Constitutive expression of CCR7 directs effector CD8 T cells into the splenic white pulp and impairs functional activity." *J Immunol* 173(5): 3013-9.
- Valente, A. J., M. M. Rozek, et al. (1991). "Characterization of monocyte chemotactic protein-1 binding to human monocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 176(1): 309-14.
- Van Beek, E. M., F. Cochrane, et al. (2005). "Signal regulatory proteins in the immune system." *J Immunol* 175(12): 7781-7.
- Van Breedam, W., H. Van Gorp, et al. (2010). "The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner." *PLoS Pathog* 6(1): e1000730.
- Van Coillie, E., J. Van Damme, G. Opdenakker (1999). "The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines." *Cytokine Growth Factor Rev* 10(1): 61-86.
- Van Furth, R., Z. A. Cohn (1968). "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes." *J Exp Med* 128(3): 415-35.
- Vanbervliet, B., B. Homey, et al. (2002). "Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces." *Eur J Immunol* 32(1): 231-42.
- Vanderheijden, N., P. L. Delputte, et al. (2003). "Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages." *J Virol* 77(15): 8207-15.

- Varol, C., S. Yonay S. Jung (2009). "Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes." *Immunol Cell Biol* 87(1): 30-8.
- Verheesen, P., M. R. ten Haaf, et al. (2003). "Beneficial properties of single-domain antibody fragments for application in immunoaffinity purification and immuno-perfusion chromatography." *Biochim Biophys Acta* 1624(1-3): 21-8.
- Vezina, S. A., H. Loemba, et al. (1996). "Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus." *Can J Vet Res* 60(2): 94-9.
- Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (1999). "The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." *Faseb J* 13(13): 1699-710.
- Wang, S., C. Parker, et al. (2008). "Heterologous HA DNA vaccine prime--inactivated influenza vaccine boost is more effective than using DNA or inactivated vaccine alone in eliciting antibody responses against H1 or H3 serotype influenza viruses." *Vaccine* 26(29-30): 3626-33.
- Weaver, L. K., P. A. Pioli, et al. (2007). "Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors." *J Leukoc Biol* 81(3): 663-71.
- Weber, C., K. U. Belge, et al. (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." *J Leukoc Biol* 67(5): 699-704.
- Welch, S. K. y J. G. Calvert (2010). "A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection." *Virus Res* 154(1-2): 98-103.
- Wensvoort, G., C. Terpstra, et al. (1991). "Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus." *Vet Q* 13(3): 121-30.
- Wilson, E., J. F. Hedges, et al. (2002). "Bovine gamma delta T cell subsets express distinct patterns of chemokine responsiveness and adhesion molecules: a mechanism for tissue-specific gamma delta T cell subset accumulation." *J Immunol* 169(9): 4970-5.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, et al. (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science* 247(4949 Pt 1): 1465-8.
- Wong, M. M. y E. N. Fish (2003). "Chemokines: attractive mediators of the immune response." *Semin Immunol* 15(1): 5-14.
- Wurm, F. M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." *Nat Biotechnol* 22(11): 1393-8.
- Xiao-wen, H., S. Shu-han, et al. (2005). "Augmented humoral and cellular immune responses of a hepatitis B DNA vaccine encoding HBsAg by protein boosting." *Vaccine* 23(14): 1649-56.
- Yang, H. y R. M. Parkhouse (1996). "Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues." *Immunology* 89(1): 76-83.
- Yang, H. y R. M. Parkhouse (1997). "Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets." *Immunology* 92(1): 45-52.
- Yang, L., M. L. Frey, et al. (2000). "Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization." *Arch Virol* 145(8): 1599-619.
- Yang, Q., C. Li, et al. (2010). "Expression, glycoform characterization, and antibody-binding of HIV-1 V3 glycopeptide domain fused with human IgG1-Fc." *Bioconjug Chem* 21(5): 875-83.
- Yarden, Y., I. Harari y J. Schlessinger (1985). "Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies." *J Biol Chem* 260(1): 315-9.
- Yoon, K. J., J. J. Zimmerman, et al. (1995). "Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection." *J Vet Diagn Invest* 7(3): 305-12.
- Yoshida, R., M. Nagira, et al. (1998b). "EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC." *Int Immunol* 10(7): 901-10.

- Yoshida, R., M. Nagira, et al. (1998a). "Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7." *J Biol Chem* 273(12): 7118-22.
- Yoshimura, T. y E. J. Leonard (1990). "Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes." *J Immunol* 145(1): 292-7.
- Yoshimura, T., E. A. Robinson, et al. (1989). "Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants." *J Exp Med* 169(4): 1449-59.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., G. Fingerle, et al. (1993). "The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages." *Eur J Immunol* 23(9): 2053-8.
- Ziegler-Heitbrock, L.P. Ancuta, et al. (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *Blood*.
- Zimmerman, J. J., D. A. Benfield, et al. (2006). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Diseases of Swine 9th ed." (Taylor DJ. Iowa): p387-416.
- Zlotnik, A., O. Yoshiey H. Nomiyama (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution." *Genome Biol* 7(12): 243.
- Zou, W., J. Borvak, et al. (2000). "Macrophage-derived dendritic cells have strong Th1-polarizing potential mediated by beta-chemokines rather than IL-12." *J Immunol* 165(8): 4388-96.
- Zuckermann, F. A. (1999). "Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells." *Vet Immunol Immunopathol* 72(1-2): 55-66.

PUBLICACIONES

Porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and in their responsiveness to CCL2

Sara MORENO, Belén ALVAREZ, Teresa PODEROSO, Concepción REVILLA,
Angel EZQUERRA, Fernando ALONSO, Javier DOMINGUEZ*

Departamento de Biotecnología, INIA, Ctra. de la Coruña km 7.5, 28040 Madrid, Spain

(Received 31 March 2010; accepted 28 July 2010)

Abstract – Monocyte subsets have been shown to differ in the pattern of chemokine receptor expression and their migratory properties, both in human and mouse. Previously we have characterized in the swine several monocyte subpopulations, based on the expression of CD163, Tük4 and SLA-II, which share features with the populations described in human and mouse. Here, we have analysed the expression of different chemokine receptors in the CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁺ and CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁻ populations of porcine monocytes. CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁻ monocytes expressed higher CX₃CR1 but lower CCR2 and CXCR4 mRNA levels than CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁺ monocytes. Moreover, porcine CCL2 binding on Tük4⁺SLA-II⁻ but not on Tük4⁺SLA-II⁺ cells was detected by using a CCL2-green fluorescence protein (pCCL2-GFP) fusion protein. Finally, flow cytometric analyses of monocytes recovered after chemotaxis assays show a clear increase in the proportion of Tük4⁺SLA-II⁻ cells in the fraction migrating toward CCL2, consistent with the polarized CCR2 expression in this monocyte population. The pattern of expression of these chemokine receptors reinforces the similarities of these porcine subsets with their human and mouse counterparts.

porcine monocyte / chemokine receptor / chemotaxis

1. INTRODUCTION

Monocytes play critical roles in innate and adaptive immunity and can be considered potential targets for vaccine delivery, as they are circulating precursors of macrophages and dendritic cells (DC). However, the successful development of such vaccination strategies would require a better understanding of the mechanisms that control the traffic and recruitment of these cells to specific tissues and their potential for further functional differentiation *in vivo*.

Monocytes constitute a heterogeneous population comprising several subsets of cells with distinct phenotypes and functional properties. In humans and mice, two major monocyte

populations differing in phenotype and migratory and differentiation capacities have been characterized [12, 19]. Human CD14^{hi}CD16⁻ classical monocytes express high levels of CCR2 and low levels of CX₃CR1 and are CD62L⁺, whereas CD14^{lo}CD16⁺ monocytes express low levels of CCR2 and high levels of CX₃CR1, and are CD62L⁻ [10, 21]. Their counterparts in mice are Ly-6C^{hi}CCR2⁺CD62L⁺CX₃CR1^{lo} and Ly-6C^{lo}CCR2⁻CD62L⁻CX₃CR1^{hi}, respectively. Ly-6C^{hi} monocytes are recruited to inflammatory sites and give rise to macrophages and DC, whereas Ly-6C^{lo} monocytes have been proposed as precursors for steady state DC [3, 10, 21].

In the swine we have characterized two major monocyte populations based on the

* Corresponding author: juncal@inia.es

expression of CD163. Porcine CD163⁻ and CD163⁺ monocytes differ in the expression of several surface markers, the pattern of cytokine production, the accessory cell capacity and the permissiveness to virus infection [6, 7, 17, 18]. Adhesion molecules, such as VLA-4 (CD49d/CD29) and LFA-1 (CD11a/CD18), and co-stimulatory molecules CD80/CD86 are also expressed at higher levels in CD163⁺ monocytes [8]. Like human CD14⁺CD16⁺ monocytes, swine CD163⁺ monocytes can produce high amounts of TNF- α but not IL-10, and have a strong antigen presentation capacity [8, 17]. These CD163⁻ and CD163⁺ monocytes can be further subdivided into four subsets, according to the expression of SLA-II and T α k4 [22], that would correspond to different developmental stages of monocytes: CD163⁻T α k4⁺SLA-II⁻, CD163⁻T α k4⁺SLA-II⁺, CD163⁺T α k4⁺SLA-II⁺ and CD163⁺T α k4⁻SLA-II⁺ [8].

The aim of this study has been to analyse the expression of CCR2 and other chemokine receptors in the CD163⁻T α k4⁺SLA-II⁻ and CD163⁺T α k4⁻SLA-II⁺ populations and their *in vitro* migratory properties in response to CCL2/MCP-1.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals and cells

Blood samples were obtained from 12-month-old outbred Large-White pigs. The reported experiments have been executed in full compliance with guidelines by the ethical committee of the Institute.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on Percoll discontinuous gradients after blood sedimentation through dextran, as previously described [11]. Cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Bio-Whittaker, Verviers, Belgium), containing 10% foetal calf serum (FCS, Bio-Whittaker), 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol and 30 μ g/mL gentamicin (Lonza, Walkersville, MD, USA).

2.2. Monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies (mAb) to porcine CD3 (BB23-8E6, IgG2b) and CD8 α (76-2-11, IgG2a)

were kindly provided by M. Pescovitz (Indiana University, Indianapolis, IN, USA) and J. Lunney (USDA, Beltsville, MD, USA), respectively. Cross-reactive anti-human CD14 mAb T α k4 (IgG2a) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark). MAb to porcine CD45RA (3C3/9, IgG1) [4], CD163 (2A10/11, IgG1) [17], swine major histocompatibility complex class-II antigen SLA-II DR (1F12, IgG2b) [5] and CD172a/SWC3 (BL1H7, IgG1) [1] were produced in our laboratory.

For multi-colour immunofluorescence assays, anti-SLA-II mAb 1F12 was purified by affinity chromatography on Protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and labelled with either biotin or Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

2.3. Flow cytometry

For single-colour staining, cells ($2-5 \times 10^5$ /well) were incubated with 50 μ L of unlabelled mAb for 30 min at 4 °C. After washed in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide (FACS buffer), cells were incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated rabbit (Fab')₂ anti-mouse immunoglobulin (Dako). Then they were washed in FACS buffer and fixed in 0.1% formaldehyde prior to analysis in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

For two-colour staining, cells were incubated with T α k4 followed by Allophycocyanin (APC)-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Becton Dickinson). After washing, free binding sites were blocked with 5% normal mouse serum. Then Alexa 488- or biotin-conjugated anti-SLA-II mAb was added and biotinylated mAb were detected with streptavidin-PerCP (Pharmingen, San Jose, CA, USA). Subsequently, cells were washed and fixed in formaldehyde prior to analysis by flow cytometry.

2.4. Chemokine binding assay

PBMC or monocytes (2.5×10^5 /well) were washed with FACS buffer and incubated for 30 min on ice with various dilutions of supernatant from a transfected CHO cell line stably expressing CCL2-GFP. Then cells were incubated with Alexa 488-conjugated rabbit anti-GFP IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 30 min. After thorough washing with FACS buffer, cells were fixed with 0.1% paraformaldehyde in PBS and analysed by flow cytometry. To assess CCL2 binding to different monocyte subsets, PBMC were incubated for

30 min on ice with 50 μ L/well of supernatant of the CHO/CCL2-GFP cell line, followed by Alexa 488-conjugated rabbit anti-GFP IgG. Then, selected combinations of T α k4, CD172a and biotin-labelled SLA-II specific mAb were added and revealed with secondary antibodies labelled with APC, PE or streptavidin-PerCP, respectively, as above described. Isotype matched unlabelled and biotinylated mAb were used as controls.

2.5. Sorting of monocyte subpopulations

Monocytes were magnetically isolated from PBMC using the autoMACS cell-sorting technique (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). PBMC were first depleted of lymphocytes using a cocktail of mAb to CD3 (T cells), CD8 α (T subpopulation and natural killer cells) and CD45RA (B cells and a T-cell subset). More than 95% of the resultant cells were CD172a⁺. For sorting of the CD163⁺SLA-II⁺ monocyte subpopulation, the monocyte-enriched fraction was incubated on ice with a mixture of mAb to CD163 and SLA-II for 30 min, washed with PBS containing 5% FCS, and 2.5 mM EDTA and 0.1% sodium azide (MACS buffer) and then incubated with goat anti-mouse IgG magnetic microbeads for 15 min. After washing with MACS buffer, the cell suspension was passed through the autoMACS separation column to deplete monocytes expressing these markers. The effluent negative fraction was analysed by flow cytometry and contained more than 95% of CD163⁺T α k4⁺SLA-II⁺ monocytes.

For sorting of the CD163⁺T α k4⁺SLA-II⁺ monocyte subpopulation, the monocyte-enriched fraction was incubated with T α k4 and passed through the autoMACS separation column. The effluent negative fraction was then incubated with the anti-CD163 mAb and magnetic microbeads as described above. Cells were passed through the autoMACS column and magnetically labelled cells (CD163⁺T α k4⁺) were collected. Its analysis by flow cytometry determined that this fraction contained more than 95% of CD163⁺T α k4⁺SLA-II⁺ monocytes.

2.6. RT-PCR analysis of chemokine receptor mRNA expression

Total RNA was isolated from cells using the Tripure Isolation Reagent (Roche, Mannheim, Germany) [9]. First-strand cDNA was obtained from 5 μ g of total RNA, previously denatured by heating for 2 min at 65 °C and immediately placed on ice, in a total volume of 50 μ L, containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.6), 75 mM KCl, 1 mM MnSO₄,

10 mM DTT, 50 μ M of each dNTP, 0.5 mM oligo(dT), 20 U of RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) and 12.5 U of Moloney murine leukaemia virus RT (Epicentre, Madison, WI, USA). Reaction mixtures were incubated for 1 h at 37 °C. For PCR, a variable amount of the cDNA (typically 1 μ L) was used in a total volume of 25 μ L of a PCR mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.005% Tween-20, 0.005% Nonidet P-40, 0.5 to 2 mM MgCl₂ (depending on the oligonucleotide pair), 50 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 10 pmol of each specific oligonucleotide (forward and reverse primers) and 1 U of DyNAzyme II DNA polymerase (Finnzymes Oy, Espoo, Finland).

Primers for amplification of chemokine receptors (Tab. I) were selected from the nucleotide sequences of *Sus scrofa* CCR2 (GenBank accession number AB119271), CCR5 (AB119272), CCR6 (DQ991099), CCR7 (AB090356), CXCR1 (NM001001622) and CXCR4 (AB116560) and of the conserved regions of *Homo sapiens* CX₃CR1 (BC028078). PCR amplifications were performed by 40 cycles consisting of template denaturation (94 °C, 45 s), primer annealing (52–62 °C, depending on the oligonucleotide pair, 30 s) and extension (72 °C, 1 min). PCR products were run on 1.5% agarose gels. Expected amplified fragment sizes are shown in Table I. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin expression were used for quantitative and qualitative control of RNA. Specificity of the PCR products was verified by DNA sequencing.

2.7. Cloning and expression of recombinant porcine CCL2/MCP-1

Total RNA was isolated from CD172⁺ cells and the corresponding cDNA obtained as above described. Based on the complete sequence of porcine CCL2 (GeneBank accession number NM214214), two primers were designed for PCR amplification of full-length coding cDNA (Tab. I). The template cDNA (2 μ L) was used in a total volume of 25 μ L of a PCR mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.005% Tween 20, 0.005% Nonidet P-40, 1 mM MgCl₂, 50 μ M each dNTP, 10 pmol each of specific oligonucleotides, and 1 U of DyNAzyme II DNA polymerase. After denaturation of cDNA at 94 °C for 5 min, amplification was performed for 35 cycles at 94 °C for 30 s, 62 °C for 30 s and 72 °C for 45 s followed by an extra-extension time of 10 min at 72 °C. After agarose-gel electrophoresis of PCR-amplified products, a band of approximately 328 base pairs was purified from the gel and cloned into the

Table 1. Primers and PCR conditions used in this study.

Molecule	Primers	Sequence	Product	T _m
CCR7	CCR7F	GGC TCA AGA CCA TGA CCG AC	712	
	CCR7R	CCG ATG AAG GCG TAC AAG		
CCR4	CCR4F	CTC CCT GAG AGC AAG GAC	364	
	CCR4R	CTC CAG GAA GAG CAC CAC		
CXCR3	CXCR3F	GCC CTC TTC AAC ATC AAC TTC	612	52
	CXCR3R	CAG CAT CCA CAT CCG CTC		
CX ₃ CR1	CX3CR1F	CAA CAG CAA GAA GCC CAA G	444	
	CX3CR1R	AGC AGG GGG AGT AGG AAG		
CCR2	CCR2F	TTG TGT GAC CCA AGA GAG ACT TAC G	529	58
	CCR2R	GTT ACA GCC AAA CCA TCC TAA AGC		
CCR5	CCR5F	GCA ATG AGA AGA AGA AGC ACA AGG	493	55
	CCR5R	GGA GCA GAT GCC AAA CGG ATA G		
CXCR4	CXCR4F	TTA CAC AGA GGA TGA CTT GGG CTC	707	57
	CXCR4R	GGA TGA GGA TAA CGG TGG TTT TG		
CCR1	CCR1F	AAGGGCTATGATGCAACCAC	504	53
	CCR1R	CTGGGTCTTGGAAGAGTGGG		
CCR6	CCR6F	CTGGTGACGGCCGTCAACCTG	191	60
	CCR6R	TTACACACACAGGTCTTTCATGATC		
CCL2	CCL2F	CCTCATCCATCCAGCATGAAGGTCTCTGC	328	62
	CCL2R	GGTGGAATCAAGCTTCAAGGCTTCGG		
CCL2-GFP	CCL2GFPR	GAGGCTTCGGAGTTTGGTCTTCTGTCCAGG	313	62
CCL2-V5	CCL2V5R	AGGCTTCGGAGTTTGGTCTTCTGTCCAGG	312	62
GAPDH	GAPDHF	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAG	285	55
	GAPDHR	AAGTTGTCTATGGATGACCTTGGCCA		
B-Actin	B-Actin-F	TGCTGTCCCTGTACGCCTCTG	220	55
	B-Actin-R	ATGTCCCGCACGATCTCCC		

pcDNA3.1 plasmid following the manufacturer instructions (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Several clones were sequenced to confirm the orientation and the integrity of the inserts.

Two new anti-sense primers were designed to clone the full-length CCL2 ORF as fusion proteins to GFP and V5-His. PCR amplifications were carried out using DyNAzyme II DNA polymerase with CCL2F primer and the corresponding anti-sense primer (CCL2-GFPR or CCL2-V5HR) (Tab. 1). The respective PCR products were cloned into pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO or pcDNA3.1/V5-His-TOPO, according to the manufacturer protocol (Invitrogen). Several clones of each construct (pCCL2-GFP or pCCL2-V5-His) were sequenced to confirm the orientation and the integrity of the inserts.

2.8. Recombinant fusion proteins production

CHO cells were transfected with plasmid pCCL2-GFP, encoding CCL2-GFP fusion protein, by using the Lipofectamine Plus Reagent (Invitro-

gen). The day prior to transfection 3×10^5 CHO cells were placed in M6 plates (Nunc, Rochester, USA) and grown in Dulbecco's modified Eagle's minimal medium (DMEM) (BioWhittaker) supplemented with 30 µg/mL gentamicin, 2 mM L-glutamine and 10% FCS. Immediately before transfection, cells were rinsed with medium without serum or antibiotics (transfection medium, TM). For each well, 500 ng of plasmid DNA and 6 µL of PLUS reagent were mixed, diluted in 100 µL of TM and incubated for 15 min at room temperature. After that, 4 µL of Lipofectamine diluted in 900 µL of TM was added to the transfection mixture. After 15 min of incubation at room temperature, DNA-Lipofectamine complexes were added to the cells and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 4 h. Then, 1 mL of fresh growth medium was added and cells cultured for 24 h. Monensin (2 µg/mL), a protein secretion inhibitor, was added 4 h before harvesting. Cells were washed and analysed in a flow cytometer. Non-transfected cells and cells incubated with Lipofectamine were used as negative controls.

Cells were then selected for stable plasmid integration using geneticin (Gibco G-418, Grand Island, NY, USA) at a concentration of 800 $\mu\text{g/mL}$. After the initial selection period of 10 days, two rounds of limiting dilution cloning were performed. Isolated clones were expanded and screened by flow cytometry and Western analysis for the production of the fusion protein.

2.9. Western blot analysis

Transfected CHO cells (2×10^5) were treated with 2 $\mu\text{g/mL}$ Monensin (Sigma, St. Louis, MO, USA), washed with PBS and solubilized in 0.2 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mg/mL BSA, 10 $\mu\text{g/mL}$ of aprotinin and 1 mM PMSF). After centrifugation, the supernatant was mixed with electrophoresis sample buffer, boiled and run on a 15% SDS-PAGE gel under reducing conditions. Separated proteins were transferred to nitrocellulose and fusion proteins analysed by Western blotting with a biotin-conjugated goat anti-GFP polyclonal antibody (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA) and streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Peroxidase activity was visualized using the ECL detection assay (GE Healthcare).

2.10. Chemotaxis assays

Monocyte subset migration was measured by chemotaxis through a 5 μm -pore polycarbonate filter in Transwell chambers (Corning, Lowell, MA, USA). Enriched blood monocytes (3.5×10^5 cells) were resuspended in RPMI with 1% BSA and 25 mM HEPES and placed in the top chamber. Serial dilutions of pCCL2-GFP were added to the lower chamber. Two or more replicate wells were used for each point. After 2 h incubation, migrated cells were analysed by flow cytometry. The migration index was determined as the ratio between cells migrated in response to the chemokine and to the inverted construction used as control.

3. RESULTS

3.1. Differential expression of chemokine receptor mRNA transcripts in monocyte subsets

Enriched peripheral blood monocytes from healthy pigs were magnetically sorted based on the expression of SLA-II, T α 4 and

CD163. Two discrete populations were selected, one expressing high levels of T α 4 but neither SLA-II or CD163, and other expressing SLA-II and CD163, but not T α 4 (Figs. 1A and 1B).

The expression of CCR2, CX $_3$ CR1, CCR5, CXCR4, CCR7, CXCR1 and CCR6 transcripts in these monocyte subsets was determined by RT-PCR (Fig. 1C). GAPDH is shown as quantitative and qualitative control of RNA, this housekeeping gene was chosen by its stability in many tissues [24], parallel amplification of a fragment of beta-actin gene as a second control (not shown) gave identical results. CCR2, CXCR4 and CX $_3$ CR1 expression differed between these cell populations. CCR2 and CXCR4 mRNA were clearly detected in CD163 $^-$ T α 4 $^+$ SLA-II $^-$ but not detected or detected at low levels in CD163 $^+$ T α 4 $^-$ SLA-II $^+$ cells; whereas CX $_3$ CR1 expression was negative in CD163 $^-$ T α 4 $^+$ SLA-II $^-$ cells but positive in CD163 $^+$ T α 4 $^-$ SLA-II $^+$ cells. Both subsets expressed CCR5 mRNA at similar levels. CCR7 was clearly detected in the whole monocyte population, but its expression was mostly negative in these two subsets. CXCR1 and CCR6 mRNA were very weak or undetectable in the whole monocyte population as well as in the sorted monocyte subsets.

3.2. Differential responsiveness of T α 4 $^+$ SLA-II $^-$ and T α 4 $^-$ SLA-II $^+$ monocytes to CCL2

We next tested whether the different expression of CCR2 in these two monocyte subsets was associated with a distinct response to CCL2 in chemotaxis assays. To clone the porcine CCL2, primers CCL2F and CCL2R that flank the CCL2 translation start and stop codons were designed based on the sequence available in databases and used for PCR amplification of the full-length coding sequence of porcine CCL2 (Tab. I). Since no specific antibodies were available at that time for detecting its expression, we made a GFP tagged construct by subcloning in the plasmid pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO the porcine CCL2 full-length coding sequence in frame with that of GFP (pCCL2-GFP). Another plasmid containing the CCL2 sequence in an inverted orientation fused with GFP

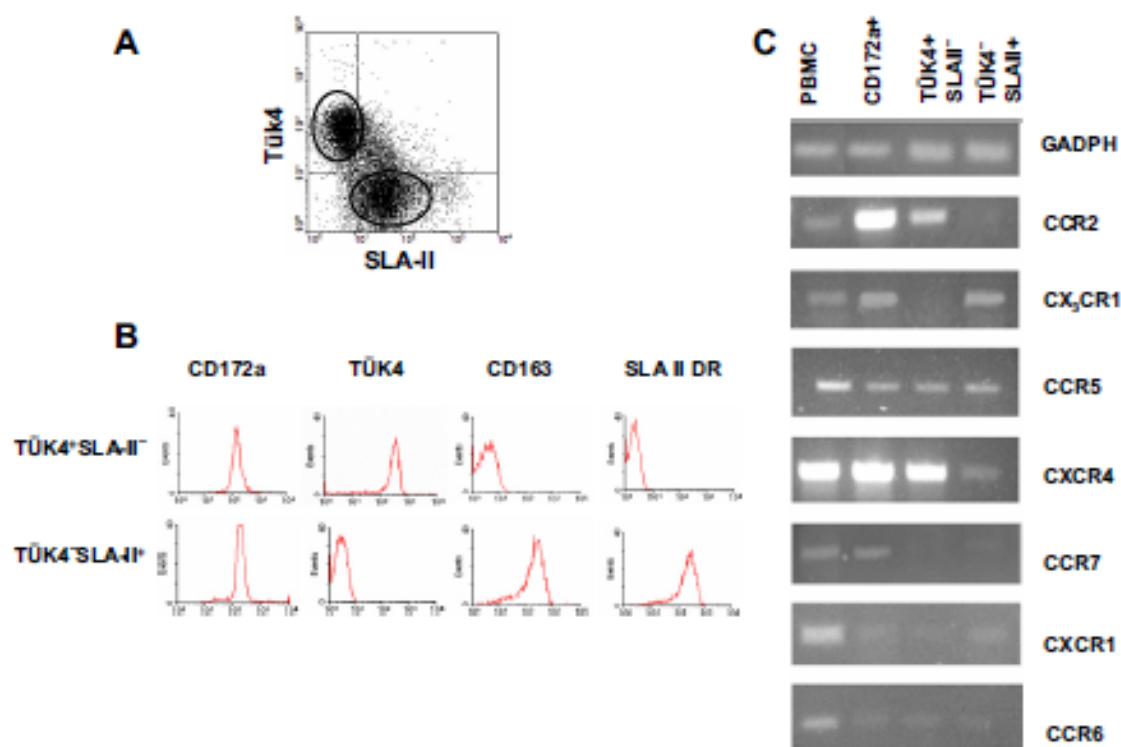


Figure 1. Chemokine receptor mRNA expression in monocyte subsets. (A) Dot plot of Tük4 versus SLA-II expression in monocytes obtained from PBMC (20 000 cells were acquired). Three subsets can be identified: Tük4⁺SLA-II⁻, Tük4⁺SLA-II⁺, and Tük4⁻SLA-II⁺. (B) The Tük4⁺SLA-II⁻ and Tük4⁺SLA-II⁺ monocyte subsets were magnetically isolated as described in Materials and methods section, and the expression of the indicated markers was analysed by flow cytometry (5 000 cells acquired). (C) Total RNA isolated from PBMC, the whole monocyte population (CD172a⁺) or the Tük4⁺SLA-II⁻ and Tük4⁺SLA-II⁺ monocyte subsets shown in (B) were reverse transcribed, and the cDNA amplified by PCR with specific primers for GAPDH or different chemokine receptors. PCR products were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis. Data are representative from three independent experiments using different donors. (A color version of this figure is available at www.vetres.org.)

(pInvCCL2-GFP) was also constructed. CHO cells were transfected with plasmids pCCL2-GFP or pInvCCL2-GFP and the expression of GFP-fused proteins was analysed by flow cytometry. After geneticin selection of transfectants and two rounds of limiting dilution, several cell clones stably expressing each of these constructs were obtained (Fig. 2A).

The expression of GFP-fused proteins in these clones was confirmed by Western blot using a biotin-conjugated goat anti-GFP polyclonal antibody and streptavidin-HRP. As shown in Figure 2B, a specific band with an apparent molecular weight of 39 kDa, the

expected size for the CCL2-GFP fusion protein, was clearly detected in supernatants from the CHO clones expressing pCCL2-GFP.

The functional activity of GFP-fused CCL2 was evaluated in a chemotaxis assay using purified monocytes. Supernatants from CHO cells transfected with the porcine CCL2-GFP expression plasmid showed a dose-dependent chemo-attractant activity, whereas no effect was observed with control supernatants obtained from CHO cells transfected with pInvCCL2-GFP (Fig. 2C).

Two-colour flow cytometric analyses of monocytes recovered after chemotaxis revealed

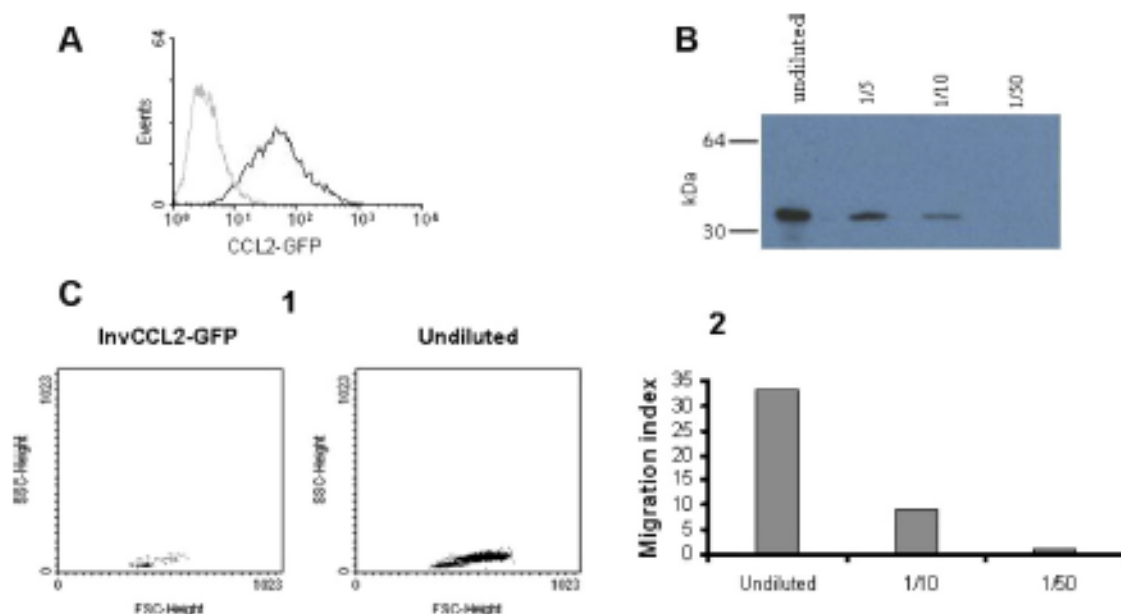


Figure 2. Expression of recombinant porcine CCL2. (A) CHO cell line stably expressing the porcine CCL2 fused to GFP. The expression of GFP fusion protein was directly analysed by flow cytometry. Non transfected CHO cells were used as negative control (grey histogram). 5 000 cells were acquired. (B) Western blot of CCL2-GFP produced by transfected CHO cells. Different dilutions of supernatant were resolved by 15% SDS-PAGE under reducing conditions and revealed with biotinylated anti-GFP and streptavidin-HRP. Numbers on the left indicate the position of MW markers. (C) Chemotactic activity of CCL2-GFP on porcine blood monocytes. Chemotaxis was assessed with the Transwell cell migration system and subsequent flow cytometry counting of migrated cells by a 45 s acquisition. (1) FSC versus SSC dot plot of migrated cells in response to supernatants from CHO cells expressing CCL2-GFP or the inverted sequence of pCCL2 fused to GFP (InvCCL2-GFP, negative control). (2) Results expressed as migration index, calculated as the ratio of the number of cells migrating to the chemokine and the number of cells in the negative control. Results from one representative experiment out of three performed are shown. (A color version of this figure is available at www.vetres.org.)

that cells migrating were mostly of the Tük4⁺SLA-II⁻ phenotype while Tük4⁻SLA-II⁺ cells did not migrate (Fig. 3A). To rule out that the increase in the proportion of Tük4⁺SLA-II⁻ cells in the migrating population was due to changes in the phenotype induced by CCL2, we analysed the effect of this chemokine on the expression of Tük4 and SLA-II markers in monocytes cultured in Teflon containers without observing significant changes in the expression of these markers (Fig. 3B).

3.3. Binding of pCCL2 to monocyte subsets

CCL2 and other chemokines bind to their receptors with enough affinity to allow their

detection by flow cytometry. Therefore we tested whether the CCL2-GFP fusion protein could bind to porcine PBMC. A clear binding of CCL2-GFP to monocytes was observed. This binding was specific since it was competed by unlabeled CCL2. Moreover, no binding was detected when supernatants from cells transfected with the InvCCL2-GFP were used (Fig. 4).

To study the CCL2 binding in different monocyte subsets, freshly isolated PBMC were incubated with CCL2-GFP and mAb to CD172a, Tük4 and SLA-II. CD172a⁺ monocytes were gated according to their FSC/SSC characteristics and the binding of CCL2-GFP to monocyte subsets, defined based on the expression of Tük4 and SLA-II, was analysed.

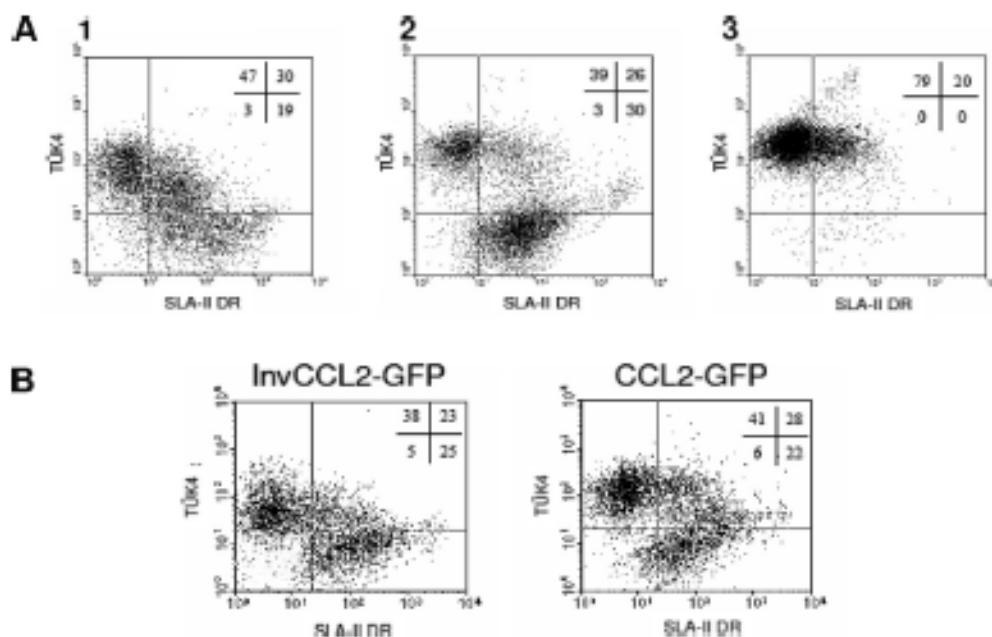


Figure 3. Differential chemotactic responsiveness of monocyte subsets to pCCL2. (A) Isolated monocytes were subjected to chemotaxis induced by CCL2 or kept under identical conditions (input) for 3 h. Input cells (1), cells that did not migrate (2) or cells that migrated (3) were recovered and the expression of Tük4 and SLA II analysed by two-colour flow cytometry. Dot plots correspond to a representative experiment out of four performed. (B) Isolated monocytes were cultured for 3 h in Teflon containers in the presence of supernatants of CHO cells transfected with pCCL2-GFP or InvCCL2-GFP, and the expression of Tük4 and SLA-II analysed by two colour flow cytometry. 10 000 cells were acquired.

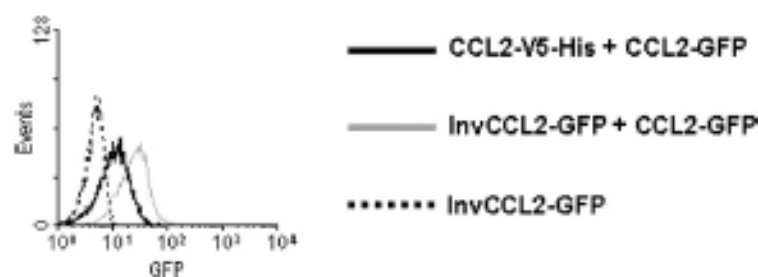


Figure 4. Inhibitory effect of unlabeled CCL2 on the binding of CCL2-GFP to porcine monocytes. PBMC were incubated with 25 μ L of supernatant containing CCL2-GFP and 25 μ L of supernatant from CHO cells transfected with a construct with the sequence of pCCL2 fused to V5-His epitope (CCL2-V5-His) or with InvCCL2-GFP. GFP bound to the cells was detected with Alexa 488- conjugated rabbit anti-GFP IgG. Histograms shown were obtained on gates corresponding to monocytes (CD172a⁺). 6 000 cells were acquired.

Tük4⁺SLA-II⁻ and Tük4⁺SLA-II⁺ monocytes showed comparable CCL2 binding ability, whereas no CCL2 binding was detected within the Tük4⁻SLA-II⁺ population (Fig. 5).

4. DISCUSSION

Circulating monocytes exhibit a marked phenotypic and functional heterogeneity, a common

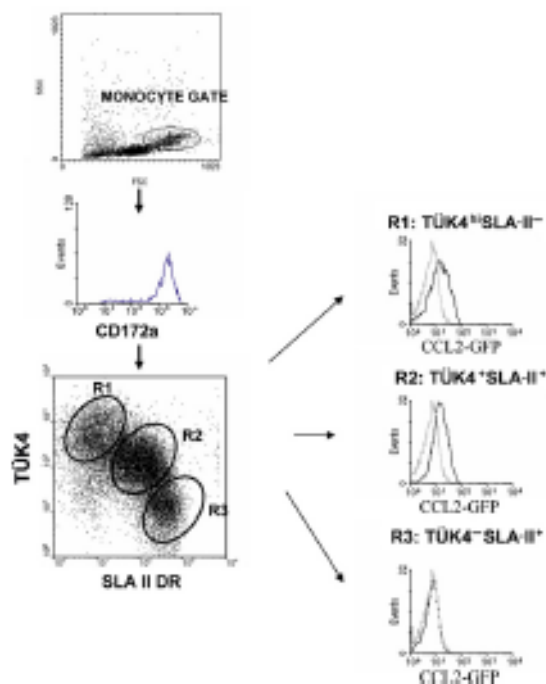


Figure 5. Differential binding of CCL2-GFP to monocyte subsets. Porcine PBMC were incubated with CCL2-GFP (CHO cell supernatant) followed by Alexa 488-conjugated rabbit anti-GFP IgG, and then double stained for Tük4 and SLA II. The histograms are gated on the appropriate monocyte subpopulation regions as defined in the dot-plots. Grey histograms show the background fluorescence of monocytes incubated with supernatants from CHO cells transfected with the InvCCL2-GFP construct. 25 000 cells were acquired. (A color version of this figure is available at www.vetres.org.)

feature in every mammalian species studied, which appears to be related with their maturation stage [12]. Human monocytes have been divided in two major subsets according to the expression of CD16 and CD14 [28]. Monocyte subsets have also been identified in mouse and rat, based on the expression of Ly-6C and CD43, respectively, and on that of the chemokine receptors CCR2 and CX₃CR1 [10, 16, 20, 27]. These monocyte subsets may play different functional roles in immunity and inflammation; they have distinct migration patterns by which they are recruited into tissues and they can give rise to distinct DC and macrophages.

In previous studies we have characterized four subsets of porcine monocytes which differ in the levels of expression of Tük4, an anti-human CD14 mAb crossreacting in pig [22], CD163 and SLA-II antigens, and appear to represent sequential stages of the monocyte maturation [8]. Within this maturation pathway, the CD163⁺Tük4^{hi}SLA-II⁻ subset would correspond to the most immature stage, and the CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁺ to the most mature. Like human CD16⁺ monocytes, porcine CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁺ monocytes exhibit a phenotype more closely related to macrophages, produce higher levels of TNF and have higher antigen presenting potential [6, 8].

In this study we have analysed in the swine the expression of chemokine receptors in two blood monocyte subsets, corresponding to the first and late stages of their maturation. RT-PCR analyses showed that CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁻ and CD163⁺Tük4⁺SLA-II⁺ monocytes differ in the mRNA expression of CCR2 and CX₃CR1. Consistent with these data, Tük4⁺SLA-II⁻ but not Tük4⁺SLA-II⁺ monocytes bind CCL2-GFP and migrate in response to this chemokine.

The expression of other chemokine receptors, namely CCR5 and CCR7, in these porcine monocyte subsets also compares with that seen in human and murine monocytes. Thus, like human CD14^{hi}CD16⁻ and CD14^{lo}CD16⁺ [25], porcine Tük4⁺SLA-II⁻ and Tük4⁺SLA-II⁺ monocytes express similar levels of mRNA CCR5. By using mAb and flow cytometry Ancuta et al. also reported similar low levels of CCR5 expression in human CD14^{hi}CD16⁻ and CD14^{lo}CD16⁺ monocyte subsets [2]. With respect to the CCR7 expression, it was mostly negative in the two porcine monocyte subsets studied, but was clearly detected in the whole monocyte population, suggesting that it is expressed by an intermediate population. This pattern is consistent with studies in the mouse, where this receptor has been found selectively expressed in the intermediate Ly-6C^{int} population, but not in Ly-6C^{hi} or Ly-6C^{lo} cells [16]. However, we cannot rule out a minor contamination of DC in the whole monocyte population (CD172a⁺) that may contribute to CCR7.

On the other hand, differences between swine and human were observed in the expression of CXCR4 that may reflect species-specific differences. Whereas CXCR4 is expressed at higher levels in porcine Tük4⁺SLA-II⁻ monocytes than in Tük4⁺SLA-II⁺, human CD16⁺ monocytes express higher or similar CXCR4 levels than CD16⁻ and migrate more efficiently in response to SDF-1 [2].

Biotin- or fluorochrome-labelled chemokines can be an alternative or a complement to the use of antibodies for characterization of chemokine receptors. pCCL2, expressed as a fusion protein linked to GFP, maintains its chemoattractant activity and can be used, in combination with antibodies against cell surface markers to analyse the CCL2 binding capacity of different leukocyte populations. The binding seems specific, as fluorescent and unlabeled CCL2 compete for binding to their receptor.

In addition to Tük4⁺SLA-II⁻ cells, CCL2-GFP also binds to Tük4⁺SLA-II⁺, but not to Tük4⁻SLA-II⁺ cells. Consistent with this finding, a fraction of Tük4⁺SLA-II⁺ cells responded to CCL2-GFP in chemotaxis assays. Although monocyte phenotype could change upon stimulation with CCL2 [13], an effect on the phenotype of Tük4⁺SLA-II⁻ cells following stimulation with CCL2 seems unlikely, since no changes were seen by flow cytometry in cells cultured in Teflon in the presence of CCL2.

The CCL2 binding capacity of the distinct monocyte subsets correlates well with CCR2 expression, as determined by RT-PCR, suggesting that CCR2 is the main receptor for this chemokine in monocytes. Although CCL2 can also bind to D6 and Duffy/DARC "decoy" receptors [29], the expression of these receptors in monocytes is low or undetectable [14, 15]. This is consistent with previous studies which identify a single class of high affinity receptor for CCL2 in human monocytes [23, 26].

In summary, the Tük4⁺SLA-II⁻ and Tük4⁻SLA-II⁺ porcine monocyte subsets differ in the expression of CCR2 and CX₃CR1 and in their response to CCL2, reinforcing their similarities with their human and mouse counterparts. Characterization of the migratory properties of these monocyte subsets will contribute to a better

understanding of their functional roles in immune and inflammatory responses, providing relevant information for the design of more effective vaccines. Moreover, the conservation among species of migration patterns of monocyte subsets makes the swine a useful model for studying pathogenesis of inflammatory diseases in which monocytes are involved.

Acknowledgements This work was supported by grants AGL-2005-07073, CSD2006-0007 and RTA 2008-00038-00-00 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

REFERENCES

- [1] Alvarez B., Sanchez C., Bullido R., Marina A., Lunney J., Alonso F., et al., A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1, *Tissue Antigens* (2000) 55:342–351.
- [2] Ancuta P., Rao R., Moses A., Mehle A., Shaw S.K., Luscinskas F.W., Gabuzda D., Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes, *J. Exp. Med.* (2003) 197:1701–1707.
- [3] Auffray C., Sieweke M.H., Geissmann F., Blood monocytes: Development, heterogeneity and relationships with dendritic cells, *Annu. Rev. Immunol.* (2009) 27:669–692.
- [4] Bullido R., Gomez del Moral M., Doménech N., Alonso F., Ezquerro A., Domínguez J., Monoclonal antibodies to a high molecular weight isoform of porcine CD45: biochemical and tissue distribution analyses, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1997) 56:151–162.
- [5] Bullido R., Doménech N., Alvarez B., Alonso F., Babin M., Ezquerro A., et al., Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals, *Dev. Comp. Immunol.* (1997) 21:311–322.
- [6] Chamorro S., Revilla C., Alvarez B., Lopez-Fuertes L., Ezquerro A., Domínguez J., Phenotypic characterization of monocyte subsets in the pig, *Immunobiology* (2000) 202:82–93.
- [7] Chamorro S., Revilla C., Gomez N., Alvarez B., Alonso F., Ezquerro A., Domínguez J., In vitro differentiation of porcine blood CD163⁻ and CD163⁺ monocytes into functional dendritic cells, *Immunobiology* (2004) 209:57–65.

- [8] Chamorro S., Revilla C., Alvarez B., Alonso F., Ezquerro A., Dominguez J., Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation, *Immunology* (2005) 114: 63–71.
- [9] Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* (1987) 162:156–159.
- [10] Geissmann F., Jung S., Littman D.R., Blood monocytes consist in two principal subsets with distinct migratory properties, *Immunity* (2003) 19:71–82.
- [11] Gonzalez S., Mendoza C., Sanchez-Vizcaino J.M., Alonso F., Inhibitory effect of African swine fever virus on lectin-dependent swine lymphocyte proliferation, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1990) 26:71–80.
- [12] Gordon S., Taylor P.R., Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nat. Rev. Immunol.* (2005) 5:953–964.
- [13] Green S.R., Han K.H., Chen Y., Almazan F., Charo I.F., Miller Y.L., Quehenberger O., The CC chemokine MCP-1 Stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK, *J. Immunol.* (2006) 176:7412–7420.
- [14] McKimmie C.S., Fraser A.R., Hansell C., Gutierrez L., Philipsen S., Connell L., et al., Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1, *J. Immunol.* (2008) 181:3353–3363.
- [15] Pogo A.O., Chaudhuri A., The duffy protein: a malarial and chemokine receptor, *Semin. Hematol.* (2000) 37:122–129.
- [16] Qu C., Edwards E.W., Tacke F., Angeli V., Llodra J., Sanchez-Schmitz G., et al., Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes, *J. Exp. Med.* (2004) 200:1231–1241.
- [17] Sanchez C., Domenech N., Vazquez J., Alonso F., Ezquerro A., Dominguez J., The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation, *J. Immunol.* (1999) 162:5230–5237.
- [18] Sanchez-Torres C., Gomez-Puertas P., Gomez del Moral M., Alonso F., Escribano J.M., Ezquerro A., Dominguez J., Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection, *Arch. Virol.* (2003) 148:2307–2323.
- [19] Serbina N.V., Jia T., Hohl T.M., Pamer E.G., Monocyte-mediated defense against microbial pathogens, *Annu. Rev. Immunol.* (2008) 26:421–452.
- [20] Sunderkötter C., Nikolic T., Dillon M.J., van Rooijen N., Stehling M., Drevets D.A., Leenen P.J.M., Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response, *J. Immunol.* (2004) 172:4410–4417.
- [21] Tacke F., Randolph G., Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets, *Immunobiology* (2006) 211:609–618.
- [22] Thacker E., Summerfield A., McCullough K., Ezquerro A., Dominguez J., Alonso F., et al., Summary of workshop findings for porcine myelomonocytic markers, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2001) 80:93–109.
- [23] Valente A.J., Rozek M.M., Schwartz C.J., Graves D.T., Characterization of monocyte chemotactic protein-1 binding to human monocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1991) 176:309–314.
- [24] Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* (2002) 3:7.
- [25] Weber C., Belge K.U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., et al., Differential chemokine receptor expression and function in human monocytes subpopulations, *J. Leukoc. Biol.* (2000) 67:699–704.
- [26] Yoshimura T., Leonard E.J., Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes, *J. Immunol.* (1990) 145:292–297.
- [27] Yrlid U., Jenkins C.D., MacPherson G.G., Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions, *J. Immunol.* (2006) 176:4155–4162.
- [28] Ziegler-Heitbrock H.W., Fingerle G., Strobel M., Schraut W., Stelter F., Schutt C., et al., The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages, *Eur. J. Immunol.* (1993) 23:2053–2058.
- [29] Zlotnik A., Yoshie O., Nomiya H., The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution, *Genome Biol.* (2006) 7:243.

